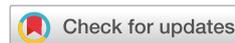


УДК 615.012.6:578.7:578.833.1

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>

Оригинальная статья | Original article



Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах

К.В. Каа ✉, Г.М. Игнатьев, А.А. Синюгина, А.А. Ишмухаметов

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, поселок Института полиомиелита, вл. 8, к. 1, Москва, 108819, Российская Федерация

✉ Каа Константин Владимирович; kaa_23@mail.ru

Резюме

Рост случаев заболевания лихорадкой Чикунгунья регистрируется в странах Карибского бассейна, Центральной и Южной Америки и Юго-Восточной Азии. Специфического лечения против этого заболевания нет, лечение проводится симптоматическое, что делает разработку вакцин против лихорадки Чикунгунья весьма актуальной. Для разработки инактивированной цельновирионной вакцины против лихорадки Чикунгунья важен выбор чувствительной культуры клеток, которая обеспечивает высокую продукцию вируса, а также используется в производстве вакцинных препаратов.

Цель работы: изучение чувствительности различных линий клеток к заражению вирусом Чикунгунья и подбор метода культивирования клеток для максимального накопления и сбора вируса с монослоя.

Материалы и методы: в работе использовали вирус Чикунгунья штамм CHIKV_Nic, линии клеток ФЭК, MRC-5, Vero и 4647; титрование проводили на клетках линии С6/36. При подборе метода культивирования использовали культуральный флакон, клеточную фабрику, роллерную бутылку. Чувствительность клеточных линий к репродукции вируса выявляли по степени накопления инфекционного агента в культуральной жидкости (КЖ). Результат титрования учитывали на 5 сут по выраженному цитопатическому действию вируса.

Результаты: наибольшую чувствительность к заражению и максимальное накопление вируса в КЖ продемонстрировали клеточные линии 4647 и Vero. Клетки линий ФЭК и MRC-5 накапливали вирус в меньших концентрациях. Максимальные титры накопления вируса в КЖ клеточной линии Vero (7,10–7,75 lg ТЦД₅₀/мл) отмечались через 48 ч с момента заражения; оптимальной является множественность заражения (MOI) в диапазоне 0,001–0,0001 MOI/кл. При множественности заражения 0,0001 MOI/кл накопление вируса в клетках линии Vero при роллерном культивировании происходит на 2 сут с максимальным титром вируса 8,6±0,2 lg ТЦД₅₀/мл.

Выводы: линия клеток Vero соответствует требованиям стабильности и безопасности при производстве вакцины против лихорадки Чикунгунья. Определена минимальная множественность заражения культуры клеток вирусом Чикунгунья. Применение роллерного метода позволяет получить наиболее высокий выход клеточной культуры и, соответственно, наиболее высокое значение титра вируса в КЖ.

Ключевые слова: линия клеток; вирус Чикунгунья; вакцина; множественность заражения; инфекционный титр вируса; подбор минимальной инфицирующей дозы; Vero; С6/36; MRC-5; ФЭК; 4647

Для цитирования: Каа К.В., Игнатьев Г.М., Синюгина А.А., Ишмухаметов А.А. Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья и подбор метода наработки вирусного материала в промышленных объемах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):111–120. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>

© К.В. Каа, Г.М. Игнатьев, А.А. Синюгина, А.А. Ишмухаметов, 2023

Susceptibility of various cell lines to the *Chikungunya virus* and method selection for commercial-scale production of viral material

K.V. Kaa ✉, G.M. Ignatyev, A.A. Sinyugina, A.A. Ishmukhametov

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of the Institute of Poliomyelitis, Moskovsky settlement, Moscow 108819, Russian Federation

✉ Konstantin V. Kaa; kaa_23@mail.ru

Abstract

An increase in cases of chikungunya fever is reported in the Caribbean, Central and South America, and Southeast Asia. As there is no specific treatment for this disease and the only available treatment is symptomatic, it is very relevant to develop vaccines against chikungunya fever. To develop an inactivated whole-virion vaccine against the disease, it is important to choose a susceptible cell culture that both provides high virus yields and is used for vaccine production.

The aim of the study was to evaluate the susceptibility of multiple cell lines to *Chikungunya virus* infection and to select the monolayer culture method with the highest virus accumulation and yield.

Materials and methods. The study used the CHIKV_Nic strain of the *Chikungunya virus* and cell lines C6/36 (for virus titration), CEF, MRC-5, Vero, and 4647. While choosing the culture method, the authors used culture flasks, a cell factory, and roller bottles. The authors determined the susceptibility of the cell lines to viral infection by the degree of accumulation of the infectious agent in the culture fluid. The results of virus titration were calculated on day 5 on the basis of a pronounced viral cytopathic effect.

Results. The Vero and 4647 cell lines demonstrated the highest susceptibility to infection and virus concentrations in the culture fluid. The CEF and MRC-5 cell lines accumulated the virus at lower concentrations. The maximum virus titres ($7.10-7.75 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$) were observed in the culture fluid 48 h after infection. The optimal multiplicity of infection (MOI) ranged between 0.001 and 0.0001 MOI/cell. At 0.0001 MOI/cell, the virus accumulated in the Vero cells cultured in roller bottles on day 2, with the maximum virus titre being $8.6 \pm 0.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$.

Conclusions. Vero cells meet the safety and stability requirements set for the production of chikungunya vaccines. The study determined the minimum MOI of the *Chikungunya virus* for cell culture. The roller bottle culture method provides the highest cell culture yield and the highest titre of the virus in the culture fluid.

Key words:

cell line; *Chikungunya virus*; vaccine; multiplicity of infection; virus infectious titre; selection of the minimum infective dose; Vero; C6/36; MRC-5; FEK; 4647

For citation:

Каа К.В., Игнатьев Г.М., Синюгина А.А., Ишмухаметов А.А. Susceptibility of various cell lines to the *Chikungunya virus* and method selection for commercial-scale production of viral material. *Biological Products. Prevention, diagnosis, treatment*. 2023;23(1):111–120. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-111-120>

Введение

Вирус Чикунгунья, относящийся к семейству *Togaviridae* (род *Alfavirus*), имеет повсеместное распространение в странах с тропическим и субтропическим климатом [1]. Вирус передается человеку инфицированными комарами видов *Aedes aegypti* и *A. albopictus*. За последние 15 лет отмечались вызванные этим вирусом эпидемии на полуострове Индостан (2004–2009 гг.), в странах Карибского бассейна (2013–2014 гг.),

после чего вирус распространился в странах Центральной и Южной Америки [1–3]. Массового применения эффективных противовирусных препаратов не отмечается, нет данных о применении профилактических препаратов.

Заболевание характеризуется поражением скелетно-мышечной системы, что может приводить к длительной утрате работоспособности. Летальность при лихорадке Чикунгунья невысокая – преимущественно среди пациентов

с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной системы, среди новорожденных и лиц престарелого возраста. Таким образом, лихорадка Чикунгунья является как социальной, так и медицинской проблемой [1, 4]. Перенесенная инфекция формирует пожизненный иммунитет, информация о повторных случаях заболевания отсутствует [5]. Все это делает разработку и применение профилактических препаратов (вакцин) против лихорадки Чикунгунья весьма перспективными.

Технология производства инактивированных вакцин является традиционной и успешной для большого количества вирусных вакцин. Данная технологическая платформа признана одной из наиболее безопасных [6], и разработка таких вакцин не требует генетических манипуляций с вирусом. Результаты разработки прототипа вакцины культуральной очищенной инактивированной формалином против лихорадки Чикунгунья показывают в эксперименте формирование клеточного и гуморального иммунитета у мышей [7]. Для разработки инактивированной цельновирионной вакцины против лихорадки Чикунгунья важен выбор чувствительной культуры клеток, которая может обеспечить высокую продукцию вируса, а также используется в производстве вакцинных препаратов.

Цель работы – изучение чувствительности различных линий клеток к заражению вирусом Чикунгунья и подбор метода культивирования клеток для максимального накопления и сбора вируса с монослоя.

В задачи исследования входило проведение выбора линии клеток, которая соответствует требованиям стабильности и безопасности при производстве вакцины против лихорадки Чикунгунья; определение минимальной множественности заражения культуры клеток вирусом Чикунгунья; подбор метода культивирования клеток для максимального накопления вируса в культуральной жидкости для разработки цельновирионной инактивированной вакцины.

Материалы и методы

Материалы

Вирус. В работе использовали штамм CHIKV_Nic вируса Чикунгунья, полученный из рабочей коллекции вирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». История выделения и пассирования штамма CHIKV_Nic описана ранее [8]. Нуклео-

тидная последовательность штамма CHIKV_Nic представлена в GenBank, Acc. No. MN271691 и MN271692¹.

Линии клеток. В работе использовали линии клеток C6/36, ФЭК, MRC-5, Vero и 4647. На всех используемых пассажах данные культуры были свободны от бактериального заражения и микоплазмы. Подсчет клеток осуществляли в гемоцитометре по общепринятой методике [9].

Линии клеток Vero (клетки почки зеленой марьшишки) и 4647 получены из банка посевных клеток, прошедших контроль согласно требованиям ВОЗ к линиям перевиваемых клеток, используемых в качестве субстратов для производства медицинских препаратов, отдела оральной полиомиелитной вакцины ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

Линия клеток Vero получена из Европейской коллекции клеточных культур на уровне 134 пассажа (Vero WHO); создан рабочий банк культуры на уровне 139 пассажа. В работе использовали культуру клеток Vero на уровне 141 пассажа. В ходе международной аттестации банка клеток установлено, что максимальный уровень пассажа клеток линии Vero, при котором их биологические характеристики остаются стабильными и соответствуют требованиям безопасности, составляет 150 пассажей [10].

Линия клеток 4647 лицензирована в качестве первой отечественной перевиваемой линии клеток, разрешенной для использования при изготовлении медицинских иммунобиологических препаратов [11]. Культура клеток 4647 обладает стабильными биологическими и кариологическими свойствами на уровне 43–150 пассажей, является свободной от посторонних контаминантов и неонкогенной. В работе использовали линию клеток 4647 на уровне 106 пассажа.

Линия клеток MRC-5 предоставлена ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на уровне 28 пассажа. В коллекцию культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора штамм диплоидных клеток поступил в 2015 г. из коллекции АТСС. В работе использовали культуру клеток MRC-5 на уровне 30 пассажа.

Линия клеток ФЭК (фибробласты эмбрионов кур) получена из отделения по производству энцефалитной вакцины ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

Линия клеток C6/36 (клетки комара *Aedes albopictus*) получена на уровне 13 пассажа из лаборатории арбовирусных инфекций ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN271691>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN271692>

Другие материалы и питательные среды:

- культуральный флакон 25 см² с наклонным горлышком и вентиляционной крышкой (Corning, кат. № 430639);
- культуральный флакон 75 см² с наклонным горлышком и вентиляционной крышкой (Corning, кат. № 430641U);
- культуральный флакон с площадью ростовой поверхности 175 см² (Corning, кат. № 431080);
- клеточная фабрика для культивирования клеток имеет 10 культуральных полок для выращивания клеток с общей площадью ростовой поверхности 1720 см² (High Yielding PERformance Flask (HYPER Flask), Corning, кат. № 10031);
- роллерная бутылка объемом 2,0 л площадью ростовой поверхности 850 см² (Corning, кат. № 431133);
- 96-луночные прозрачные полистироловые микропланшеты с плоским дном, обработанные ТС, в индивидуальной упаковке, с крышкой, стерильные (Corning кат. № 3599);
- питательные среды и растворы производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»: среда Игла MEM, раствор Хенкса, L-15 (Leibovitz L-15 Medium). Для выращивания клеточных культур в питательную среду (450 мл) добавляли 150 мг L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед/мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина. Для среды поддержки при получении вирусосодержащей жидкости в питательную среду (450 мл) добавляли 150 мг L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина.

Методы

Пересев клеточных линий. Пересев клеток линии С6/36 проводили по мере формирования монослоя, в среднем на 4–5 сут. Рассев клеток осуществляли в культуральные флаконы (Corning, США) с площадью ростовой поверхности 25 см². Во флаконы добавляли заранее подготовленную и нагретую до температуры 32 °С питательную среду L-15 с 10% ЭТС, затем добавляли суспензию клеток С6/36 из расчета 200 тыс. кл/мл питательной среды. Далее флаконы инкубировали в термостате при 32 °С и 5% CO₂.

Линия клеток ФЭК была получена в виде суспензии первично трипсинизированных клеток, и для посева во флаконы суспензия была разбавлена питательной средой Игла MEM с добавлением 10% ЭТС, L-глутамин до посадочной концентрации 200 тыс. кл/мл. Клетки рассевали в культуральные флаконы площадью 25 см² (Corning, США) и инкубировали в термостате при 37 °С и 5% CO₂.

Линии клеток Vero, MRC-5, 4647 инкубировали в термостате (Сапуо, Япония) при 37 °С и 5% CO₂. Культивирование всех клеточных линий проводили в культуральных флаконах с площадью ростовой поверхности 25 см² (Corning, США) с использованием питательной среды Игла MEM с добавлением 10% ЭТС и L-глутамин. Монослой клеток формировался в среднем на 2–4 сут. Клеточный монослой промывали два раза 0,02% раствором Версена и один раз смесью 0,02% раствора Версена и 0,25% раствора трипсина (1:1), помещали в термостат при температуре 37 °С. Через 5 мин инкубации контролировали отделение клеток от поверхности флакона и разрушение межклеточных связей с помощью микроскопа; добавляли 10 мл питательной среды Игла MEM для нейтрализации действия трипсина и отбирали пробу 100 мкл для подсчета клеток в гемоцитометре. Концентрация клеток при посеве для формирования монослоя клеток на 2 сут составляла 0,2×10⁶ кл/мл. При культивировании клеток Vero в роллерных бутылках и клеточной фабрике посевная концентрация клеток оставалась неизменной.

Заражение клеточных линий вирусом.

Перед заражением клеточный монослой промывали два раза 5 мл раствора Хенкса и добавляли 0,5 мл суспензии вируса Чикунгунья с соответствующей множественностью заражения. Для адсорбции вируса на клетках флаконы переносили в термостат на 1 ч при температуре 37 °С и 5% CO₂, затем добавляли среду поддержки Игла MEM с 2% ЭТС. Флаконы с зараженными клетками хранили в термостате при 37 °С и содержанием 5% CO₂. Наблюдение за клеточными линиями проводили ежедневно под микроскопом до появления видимых морфологических изменений в структуре клеточного монослоя. Из культуральных сосудов отбирали пробу для определения титра и замораживали при минус 70 °С до дальнейших исследований.

Титрование вируса Чикунгунья проводили на линии клеток С6/36 и Vero в 96-луночных культуральных планшетах. Посев клеток осуществляли за 48 ч до начала титрования. Концентрация клеток при посеве 3×10⁴ кл/200 мкл. Готовили десятикратные разведения вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁹ в питательной среде L-15 (для линии клеток С6/36) или Игла MEM (для линии клеток Vero). Удаляли питательную среду из планшета с клетками и вносили по 25 мкл каждого разведения вируса на одну лунку с клеточным монослоем (на одно разведение вируса использовали 8 лунок). Далее в каждую лунку добавляли 175 мкл поддерживающей питательной среды с 2% ЭТС. В контрольные лунки с клетка-

ми вносили по 200 мкл питательной среды с 2% ЭТС. Планшеты переносили в инкубатор с температурой 32 °C и 5% CO₂.

Результат титрования учитывали на 5 сутки по выраженному цитопатическому действию и рассчитывали показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток (ТЦД₅₀), по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали его в lg ТЦД₅₀/мл [12].

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (*M*) и ошибку среднего арифметического значения (*m*). Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента; достоверно значимыми считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Чувствительность клеточных линий к вирусу Чикунгунья

Для выбора линии клеток, перспективной для создания вакцинного препарата, было проведено исследование чувствительности клеточных линий к заражению вирусом Чикунгунья. В исследовании использовались линии клеток Vero, 4647, MRC-5, ФЭК, которые наиболее часто применяются для производства вирусных вакцин².

Линия клеток С6/36 не применяется в производстве вакцинных препаратов. В данном исследовании клеточная линия использовалась для определения инфекционного титра [8].

Использованные в работе линии клеток выращивали в культуральных флаконах с площадью ротовой поверхности 25 см². Всего было приготовлено по 6 флаконов каждой исследуемой линии клеток: 3 флакона для определения чувствительности к вирусу и 3 флакона для подсчета среднего значения количества клеток. Клетки инфицировали вирусом с множественностью заражения 0,01 MOI/кл (множественность заражения, multiplicity of infection, MOI). Картина цитопатического действия (ЦПД) вируса Чикунгунья на линиях клеток Vero, MRC-5, ФЭК, 4647 представлена на *рисунке 1*.

Уровень накопления вируса определяли методом титрования на клетках С6/36 (*табл. 1*). За титр вируса принимали величину, обратную

разведению, в котором поражение клеточного монослоя в лунках составляет 50%. Значение титра вируса, полученное в результате заражения линии клеток Vero, было равно 7,6±0,2 lg ТЦД₅₀/мл; уровень накопления вируса в линии клеток 4647 по итогу титрования составил 7,8±0,2 lg ТЦД₅₀/мл. Остальные клеточные линии показали менее выраженную чувствительность. В линии клеток MRC-5 проявление ЦПД вируса наступало через 72 ч после заражения; титр вируса был равен 3,2±0,2 lg ТЦД₅₀/мл. В клетках линии ФЭК проявление ЦПД вируса не было выявлено. Значение титра вируса на клетках С6/36 было равно 1,2±0,2 lg ТЦД₅₀/мл.

При множественности заражения 0,01 MOI/кл на 1 млн клеток необходимо взять 10000 MOI, что в пересчете на значение антилогарифмов равно 4,0 lg ТЦД₅₀/флакон. Таким образом, в данном исследовании для заражения культур инфицирующая доза вируса составила 4,9–5,0 lg ТЦД₅₀/флакон в зависимости от количества клеток при заражении в каждой исследуемой линии.

Клеточные линии Vero и 4647 дают более высокий урожай вируса Чикунгунья; показатель инфекционного титра при сравнении не имеет достоверных различий, $p > 0,05$. При оценке полученных результатов титр вируса на культурах клеток Vero и 4647 достоверно выше, чем на линиях клеток ФЭК и MRC-5, $p < 0,05$.

Для дальнейших исследований нами была использована линия клеток Vero как наиболее подходящая для наработки и титрования вирусного материала. С целью определения оптимальных сроков культивирования вируса Чикунгунья изучали динамику накопления вируса в культуральной жидкости в течение первых двух суток после заражения клеточного монослоя.

Подбор минимальной инфицирующей дозы вируса Чикунгунья

Одним из путей увеличения концентрации вируса в культуральной жидкости является оптимизация множественности заражения монослоя клеток [13].

Множественность заражения является решающим фактором для развития продуктивной вирусной инфекции [13, 14]. Определе-

² Фармакопейная статья 3.3.1.0037.15 Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0024.15 Вакцина против краснухи культуральная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Вакцина гепатита А культуральная очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая «АЛЬ-ГАВАК®М». <https://grls.rosminzdrav.ru/>

Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

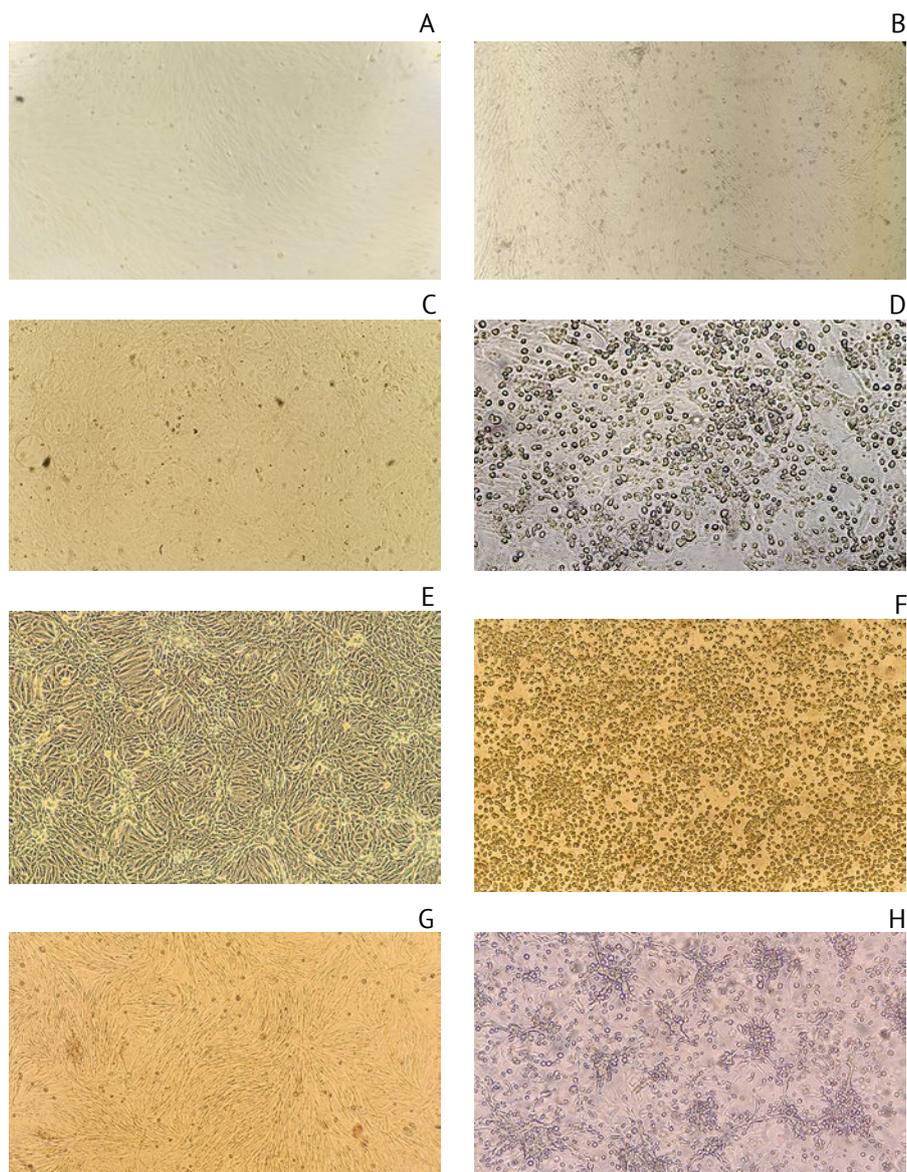


Рис. 1. Клеточные линии до и после заражения вирусом Чикунгунья. А, С, Е, G – линии клеток ФЭК, 4647, Vero, MRC-5 до заражения; В – линия клеток ФЭК через 72 ч после заражения; D – линия клеток 4647 через 48 ч после заражения; F – линия клеток Vero через 48 ч после заражения; H – линия клеток MRC-5 через 72 ч после заражения. Увеличение $\times 200$.

Fig. 1. Cell lines before and after infection with the *Chikungunya virus*. A, C, E, and G show CEF, 4647, Vero, and MRC-5 cell lines before infection, respectively; B, CEF cell line 72 h after infection; D, 4647 cell line 48 h after infection; F, Vero cell line 48 h after infection; H, MRC-5 cell line 72 h after infection (200 \times magnification).

ние оптимальной заражающей дозы вируса Чикунгунья при культивировании в линии клеток Vero являлось необходимым условием для проведения дальнейших экспериментов по получению и наработке вакцинного препарата. В работе А.Г. Куслия с соавт. [15] при разработке вакцины против венесуэльского энцефаломиелита лошадей, который так же, как и вирус Чикунгунья, относится к роду *Alphavirus*, заражали клеточную линию диплоидных клеток фибробластов эмбрионов человека Л-68 инфицирующей дозой вируса 0,1–0,01 БОЕ/кл. В нашем эксперименте

заражение культуры клеток Vero во флаконах с площадью ростовой поверхности 25 см² проводили разными дозами вируса Чикунгунья (0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,000001 МОI/кл) с дальнейшей заморозкой флаконов при минус 70 °С через 24, 48, 72 и 96 ч. На каждую инфицирующую дозу использовали по 3 флакона и дополнительно 3 контрольных флакона для определения количества клеток перед заражением. Для заражения клеток использовали вирус Чикунгунья, полученный на линии клеток Vero, с титром $7,6 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Таблица 1. Результаты оценки титра вируса Чикунгуны, полученного с разных клеточных линий
Table 1. Results of the assessment of *Chikungunya virus* titres obtained in different cell lines

Линия клеток <i>Cell line</i>	Количество клеток во флаконе при заражении, $\times 10^6$ <i>Number of cells per vial at infection, $\times 10^6$</i>	Множественность заражения, MOI/кл <i>Multiplicity of infection, MOI/cell</i>	Время проявления ЦПД, ч <i>CPE manifestation time, h</i>	Титр вируса при титровании на линии клеток C6/36, \lg ТЦД ₅₀ /мл ($M \pm m$) <i>Virus titre determined on C6/36 cells, \log_{10} TCID₅₀/mL ($M \pm m$)</i>
C6/36	8,0 \pm 0,3	0,01	72	6,2 \pm 0,2
MRC-5	8,5 \pm 0,3		72	3,2 \pm 0,2
ФЭК <i>CEF</i>	7,5 \pm 0,3		–	1,2 \pm 0,2
Vero	10,0 \pm 0,3		48	7,6 \pm 0,2
4647	9,8 \pm 0,3		48	7,8 \pm 0,2

Примечание. ЦПД – цитопатическое действие вируса, ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток. «–» – значение не определяли, клеточный монослой полностью разрушен.

Note. CPE, cytopathic effect of the virus, TCID₅₀, tissue culture infective dose causing 50% cell death; –, not determined because of complete destruction of the cell monolayer.

Результаты эксперимента представлены в таблице 2. Разрушение клеточного монослоя при множественности заражения 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 MOI/кл наблюдалось через 48 ч после внесения вируса, при множественности заражения 0,00001 и 0,000001 MOI/кл дегенерация клеточного монослоя проявилась через 72 ч.

Как следует из полученных данных, при множественности заражения 0,0001 MOI/кл титр вируса равен 7,75 \pm 0,2 \lg ТЦД₅₀/мл, накопление вируса в культуральной жидкости происходит на вторые сутки. При множественности заражения 0,00001 MOI/кл максимальное накопление вируса наблюдается на третьи сутки, титр вируса равен 7,4 \pm 0,2 \lg ТЦД₅₀/мл, что достоверно не отличается от дозы 0,0001 MOI/кл, $p \geq 0,05$. Заражение клеток дозой 0,000001 MOI/кл обеспечивает накопление вируса на порядок ниже по сравнению с дозой 0,00001 MOI/кл: 6,55 \pm 0,2 \lg ТЦД₅₀/мл против 7,4 \pm 0,2 \lg ТЦД₅₀/мл (различия статистически достоверны, $p \leq 0,05$). Следует отметить, что даже при столь малой дозе заражения 0,000001 MOI/кл отмечается накопление вируса. При заражении дозами 0,1 и 0,01 MOI/кл накопление вируса происходит через 24 ч после заражения и далее идет снижение.

Исходя из полученных данных, оптимальными для заражения являются дозы в диапазоне 0,001–0,0001 MOI/кл; накопление вируса Чикунгуны в линии клеток Vero наступает через 48 ч после заражения.

Подбор оптимального метода культивирования клеточной линии Vero для накопления вируса Чикунгуны в культуральной жидкости

Разные методы культивирования позволяют повысить концентрацию клеток на единицу объема питательной среды за счет увеличения

соотношения ростовой поверхности к объему культурального сосуда [16]. В работе использовали линии клеток Vero, выращенные в разных культуральных сосудах, с возможностью дальнейшего заражения вирусом Чикунгуны дозой 0,0001 MOI/кл. Культуральные сосуды были выбраны по критерию наибольшей практичности в производстве; при этом они сочетают такие показатели, как высокий урожай клеток, доступность для лабораторий, безопасность и простота в использовании. В опыте использовали по 3 наименования каждого флакона и дополнительно 3 контрольных флакона каждого вида для определения количества клеток перед заражением. Были выбраны следующие культуральные сосуды:

- культуральный флакон с площадью ростовой поверхности 175 см²;
- клеточная фабрика с площадью ростовой поверхности 1720 см²;
- роллерная бутылка объемом 2,0 л с площадью ростовой поверхности 850 см².

Культуральные флаконы с сформированным монослоем клеток Vero заражали вирусом Чикунгуны дозой 0,0001 MOI/кл. Перед заражением клеточный монослой промывали раствором Хенкса (2 раза по 100 мл) и добавляли 5 мл суспензии вируса Чикунгуны; в случае с клеточной фабрикой дозу вируса добавляли в объеме 50 мл. Флаконы и клеточные фабрики с зараженными клетками переносили в термостат с температурой 37 °C и 5% CO₂. Роллеры переносили в специальный роллерный термостат (Bellco) с температурой 37 °C. Оценку состояния клеточного монослоя до проявления ЦПД проводили ежедневно с помощью микроскопа. Монослой клеток полностью разрушался под действием вируса через 48 ч. Из культуральных сосудов

Таблица 2. Влияние множественности заражения клеток вирусом Чикунгунья на уровень накопления вируса в линии клеток Vero
Table 2. Influence of the *Chikungunya virus* multiplicity of infection on the level of virus accumulation in the Vero cell culture

Множественность заражения, MOI/кл <i>Multiplicity of infection, MOI/cell</i>	Количество клеток во флаконе при заражении, $\times 10^6$ <i>Number of cells per vial at infection $\times 10^6$</i>	Доза вируса при заражении клеток, lg ТЦД ₅₀ /флакон <i>Dose of the virus at infection, log₁₀ TCID₅₀/vial</i>	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл ($M \pm m$), полученный через (часы культивирования) <i>Virus titre, log₁₀ TCID₅₀/mL ($M \pm m$), obtained after (hours of cultivation)</i>			
			24	48	72	96
0,1	10,9 \pm 0,1	6,0–6,1	7,6 \pm 0,2	6,3 \pm 0,2	–	–
0,01		5,0–5,1	7,4 \pm 0,1	6,4 \pm 0,2	–	–
0,001		4,0–4,1	7,06 \pm 0,2	7,1 \pm 0,5	–	–
0,0001		3,0–3,1	6,2 \pm 0,5	7,75 \pm 0,2	–	–
0,00001		2,0–2,1	3,4 \pm 0,2	4,85 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2	–
0,000001		1,0–1,1	3,3 \pm 0,2	4,9 \pm 0,2	6,55 \pm 0,2	–

Примечание. ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток; MOI – множественность заражения; «–» – значение не определяли, клеточный монослой полностью разрушен.

Note. TCID₅₀, tissue culture infective dose causing 50% cell death; MOI, multiplicity of infection; –, not determined because of complete destruction of the cell monolayer.

отбирали пробу для определения титра и замораживали при минус 70 °С. Результаты титрования представлены в *таблице 3*.

Анализ экспериментальных данных (*табл. 3*) показал, что культивирование клеток с использованием роллерных бутылей позволяет достигать высокой урожайности клеток и, соответственно, высокого титра вируса 8,6 \pm 0,2 lg ТЦД₅₀/мл. При накоплении вирусосодержащей жидкости на клетках Vero в культуральном флаконе значение титра вируса было на порядок ниже (7,65 \pm 0,2 lg ТЦД₅₀/мл). Различия статистически достоверны между титром вируса в вирусосодержащей жидкости, собранной при роллерном культивировании, и при культивировании вируса в культуральном флаконе ($p < 0,05$). Культивирование клеток линии Vero с использованием клеточной фабрики дает схожие результаты по значению титра вируса, как и при роллерном культивировании, но имеет ряд недостатков, главный из которых – невозможность микроскопической оценки разрушения клеточного монослоя на культуральных поверхностях, используемых в клеточной фабрике, так как в поле зрения микроскопа просматривается только нижняя поверхность. Значение вирусного титра, полученное при культивировании и заражении клеток Vero в клеточной фабрике, было равно 8,2 \pm 0,2 lg ТЦД₅₀/мл; достоверных различий между значениями титра вируса, полученными при заражении клеток Vero в роллере и клеточной фабрике, не выявлено ($p > 0,05$).

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что роллерный метод культивирования

культуры клеток Vero является легкоприменимым и универсальным в производстве, подходит для наработки вирусного материала в больших объемах с высоким значением титра, что в дальнейшем может быть применимо для разработки вакцинного препарата против лихорадки Чикунгунья.

Выводы

1. Наибольшую чувствительность к заражению и накоплению вируса Чикунгунья в культуральной жидкости продемонстрировали линии клеток 4647 и Vero. Уровень накопления вируса в линиях клеток ФЭК и MRC-5 был ниже.
2. Оптимальными для заражения линии клеток Vero вирусом Чикунгунья являются дозы в диапазоне 0,001–0,0001 MOI/кл. Максимальные титры накопления вируса в культуральной жидкости отмечались через 48 ч с момента заражения – значение титра было равно 7,1–7,75 lg ТЦД₅₀/мл.
3. При сравнении разных методов культивирования клеток линии Vero с использованием различных культуральных сосудов (культуральный флакон, клеточная фабрика, роллерная бутылка) с дальнейшим заражением одинаковой дозой, равной 0,0001 MOI/кл, накопление вируса и полное разрушение монослоя клеток проявлялось через 48 ч независимо от выбранного метода культивирования. Роллерный метод культивирования клеток линии Vero является легкоприменимым и универсальным в производстве, подходит для наработки вируса Чикунгунья в больших объемах с высоким значением титра вируса.

Таблица 3. Уровень накопления вируса Чикунгунья в культуральной жидкости, полученной при использовании линии клеток Vero с применением различных методов культивирования

Table 3. Level of *Chikungunya virus* accumulation in the culture fluid obtained using the Vero cell line and various cultivation methods

Культуральный сосуд <i>Culture vial</i>	Количество клеток при заражении <i>Number of cells at infection</i>	Множественность заражения, MOI/кл <i>Multiplicity of infection, MOI/cell</i>	Время проявления ЦПД, ч <i>CPE manifestation time, h</i>	Объем вирусосодержащей жидкости, мл <i>Volume of the virus-containing fluid, mL</i>	Титр вируса, lg TCID ₅₀ /мл (M±m) <i>Virus titre log₁₀ TCID₅₀/mL (M±m)</i>
Культуральный флакон, площадь поверхности 175 см ² <i>Culture flask, surface area 175 cm²</i>	(84,0±0,2)×10 ⁶	0,0001	48	70	7,65±0,2
Клеточная фабрика, площадь поверхности 1720 см ² <i>Cell factory, surface area 1720 cm²</i>	(53,0±0,1)×10 ⁷			560	8,2±0,2
Роллерная бутылка, площадь поверхности 850 см ² <i>Roller bottle, surface area 850 cm²</i>	(45,1±0,2)×10 ⁷			450	8,6±0,2

Примечание. ЦПД — цитопатическое действие вируса, TCID₅₀ — тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток; MOI — множественность заражения.

Note. CPE, cytopathic effect of the virus; TCID₅₀, tissue culture infective dose causing 50% cell death; MOI, multiplicity of infection.

Литература/References

- Weaver SC, Lecuit M. *Chikungunya virus* and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med*. 2015;372:1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>
- Deeba F, Islam A, Kazim SN, Naqvi IH, Broor Sh, Ahmed A, Parveen S. *Chikungunya virus*: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. *Pathog Dis*. 2016;74(3):ftv119. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv119>
- Staples JE, Breiman RF, Powers AM. *Chikungunya fever*: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*. 2009;49(6):942–8. <https://doi.org/10.1086/605496>
- Caglioti C, Lalle T, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordini L. *Chikungunya virus* infection: an overview. *New Microbiol*. 2013;36(3):211–27.
- Galatas B, Ly S, Duong V, Baisley K, Nguon K, Chan S, et al. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after *Chikungunya* emergence in a Cambodian Rural Community, April 2012. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004281>
- Erasmus JH, Rossi SL, Weaver SC. Development of vaccines for *Chikungunya fever*. *J Inf Dis*. 2016;214(S5):S488–96. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw271>
- Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PV. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of *Chikungunya virus*. *Vaccine*. 2009;27(18):2513–22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.062>
- Игнатьев ГМ, Каа КВ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мефед КМ и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020;97(3):227–32. Ignatyev GM, Kaa KV, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mefed KM, et al. Indication and identification of Dengue and *Chikungunya viruses* in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(3):227–32 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
- Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: Stoddart M, ed. *Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 740. Humana Press; 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2
- Грачев ВП, Хапчаев ЮХ. Применение перевиваемых линий клеток человека и животных для изготовления вирусных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2008;(1):82–90. Grachev VP, Khapchaev YuKh. Use of continuous human and animal cell lines for the production of viral vaccines. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;(1):82–90 (In Russ.).
- Миронова ЛЛ, Грачев ВП, Кузнецова НВ, Попова ВД. Способ культивирования вирусов. Авторское свидетельство СССР № 770195; 1981. Mironova LL, Grachev VP, Kuznetsova NV, Popova VD. Virus cultivation method. Patent of the USSR No. 770195; 1981 (In Russ.).
- Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Медгиз, Ленинградское отделение; 1962.

- Ashmarin IP, Vorobyov AA. *Statistical methods in microbiological research*. Leningrad: Medgiz, Leningrad branch; 1962 (In Russ.).
13. Стрельцова МА, Агафонов АП, Игнатьев ГМ. Чувствительность культур клеток различных линий к вирусу Марбург. *Вопросы вирусологии*. 1991;36(5):437–8.
Streltsova MA, Agafonov AP, Ignat'ev GM. The sensitivity of different cell culture lines to the Marburg virus. *Problems of Virology*. 1991;36(5):437–8 (In Russ.).
14. Хапчаев ЮХ, Хоретоненко МВ, Тимофеев АВ, Грачев ВП. Репродукция штамма Софьин вируса клещевого энцефалита в клетках линии Vero, культивируемых на микроносителях в условиях псевдосuspензии. *Биотехнология*. 2003;5:32–9.
Kharпчаev YuKh, Khoretonenko MV, Timofeev AV, Grachev VP. Reproduction of the Sofyin strain of tick-borne encephalitis virus in Vero cells cultured on microcarriers under pseudosuspension conditions. *Russian Journal of Biotechnology*. 2003;5:32–9 (In Russ.).
15. Куслий АГ, Волчков ВЕ, Рыжиков АБ, Михайлова ТВ, Сергеев АН. Инактивированная вакцина против венесуэльского энцефаломиелиита лошадей и способ ее получения. Патент Российской Федерации № 2035191; 1995.
Kusliy AG, Volchkov VE, Ryzhikov AB, Mikhailova TV, Sergeev AN. Inactivated vaccine against Venezuelan equine encephalomyelitis and method for its production. Patent of the Russian Federation No. 2035191; 1995 (In Russ.).
16. Spier RE, Maroudas N. Microcarriers for animal cell biotechnology: an unfulfilled potential. *Biotechnology*. 1991;17:191–212.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-409-90123-8.50014-8>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **К.В. Каа** – проведение исследований, обработка полученных результатов, обсуждение результатов исследований, написание и критическое обсуждение текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** – разработка дизайна исследования, проведение исследований, обсуждение результатов исследований, критическое обсуждение текста рукописи; **А.А. Синюгина** – обеспечение проведения исследований, обсуждение результатов исследования; **А.А. Ишмухаметов** – концепция исследования, обсуждение результатов исследования. **Благодарности.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Г.М. Игнатьев является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Диагностика, профилактика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **K.V. Kaa** conducted the experiments, analysed the obtained results and participated in their discussion, drafted and critically reviewed the manuscript. **G.M. Ignatyev** developed the study design, conducted the experiments and participated in the discussion of their results, and critically reviewed the manuscript. **A.A. Sinyugina** facilitated the study and participated in the discussion of the experiment results. **A.A. Ishmukhametov** conceptualised the study and participated in the discussion of the experiment results.

Acknowledgements. This study was carried out with no external funding.

Conflict of interest. G.M. Ignatyev is a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Каа Константин Владимирович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>
kaa_23@mail.ru

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Синюгина Александра Александровна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>
sinyugina@chumakovs.su

Ишмухаметов Айдар Айратович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>
ishmukhametov@chumakovs.su

Konstantin V. Kaa.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>
kaa_23@mail.ru

George M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Alexandra A. Sinyugina.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>
sinyugina@chumakovs.su

Aydar A. Ishmukhametov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corr. Member of RAS.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>
ishmukhametov@chumakovs.su

Поступила 14.07.2022

После доработки 06.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 14 July 2022

Revised 6 February 2023

Accepted 13 March 2023