



Оптимизация параметров культивирования вируса SARS-CoV-2 при разработке прототипов вакцины

Семёнов С.Ф., Климович О.В., Лютина Я.В.

В настоящее время наиболее эффективным методом профилактики и контроля COVID-19 является вакцинация. В 2021-2022 гг в Республике Беларусь была разработана инактивированная вакцина против вируса SARS-CoV-2 и начата подготовка к её промышленному выпуску. Производство инактивированной вакцины в промышленном масштабе требует накопления больших количеств вируса. Целью данного исследования являлся поиск и отработка оптимальных методов и условий культивирования вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero E6 для максимизации выхода вируса.

Материалы и методы. Штамм вируса: SARS-CoV-2 РКПБА-2021-414 (B.1.617.2.122) из Республиканской коллекции патогенных биологических агентов. Штамм был выделен в 2021 году сотрудниками РНПЦ эпидемиологии и микробиологии из назофарингеального мазка пациента с COVID-19. Использовали культуру клеток Vero E6, предварительно проверенную на отсутствие микоплазм, из Коллекции культур клеток человека и животных РНПЦ Э и М. Для выращивания культуры клеток использовали культуральные флаконы T-175, роллерную установку Wheaton R2P с бутылками 850 см² и биореактор Infors HT Minifors 2 с ёмкостью на 4 л.

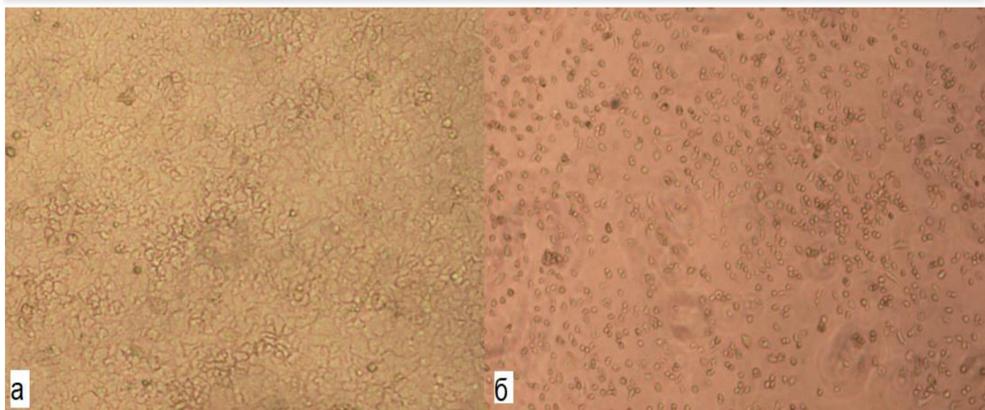


Рисунок 1. Культивирование вируса SARS-CoV-2 на культуральных флаконах. а – монослой клеток до заражения вирусом; б – цитопатический эффект на третьи сутки после заражения.

Таблица 1. Сравнение титра вируса SARS-CoV-2 при различных способах культивирования

Способ культивирования	Средний титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл	Количество ВСЖ, собираемой из одной ёмкости
Культуральные флаконы 175 см ²	6,4	50 мл
Роллерные бутылки 850 см ²	6,7	200 мл
Биореактор	6,4	3000 мл

Таблица 2. Титр вируса SARS-CoV-2 при различной множественности заражения культуры клеток Vero E6

MOI	0,1	0,01	0,001	0,0001
Средний титр, lg ТЦД ₅₀ /мл	6,7	6,5	6,8	5,8

Параметры для оптимизации:

- Способ культивирования (флаконы, роллеры, реактор);
- Количество клеток для посева;
- Количество микроносителей;
- Состав питательной среды;
- Время и режим адсорбции;
- Продолжительность роста клеток;
- Режим культивирования (скорость перемешивания, аэрация, pH);
- Множественность заражения вирусом;
- Объём среды при заражении, скорость добавления среды;
- Состав питательной среды для размножения вируса;
- Режим культивирования с вирусом (скорость перемешивания, аэрация, pH);
- Продолжительность культивирования до сбора вирусосодержащей жидкости.

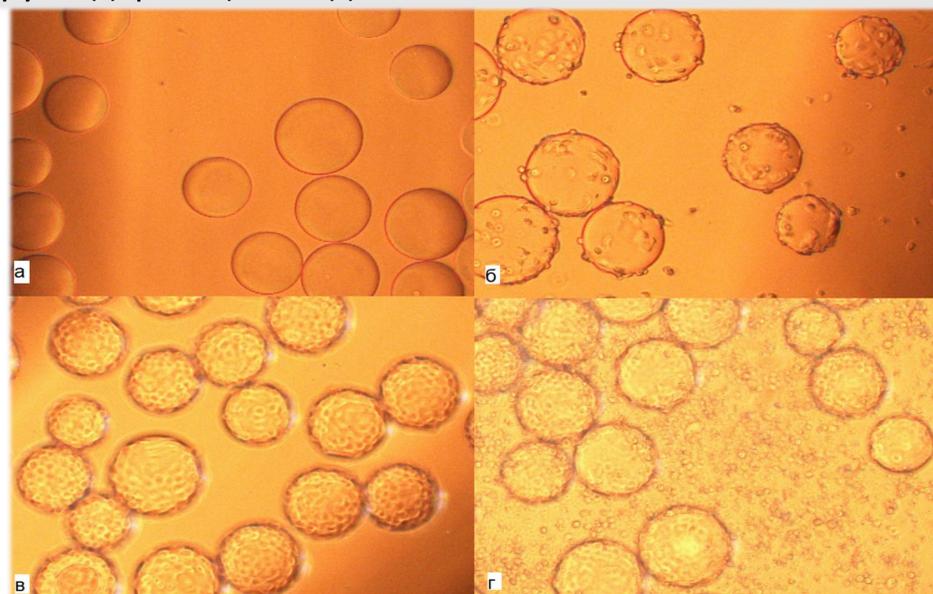


Рисунок 2. Культивирование вируса SARS-CoV-2 на микроносителях Cytodex-1. а – микроносители до внесения клеток; б - первые сутки культивирования – прикрепление клеток Vero E6 к микроносителю; в - третьи сутки – сформирован клеточный монослой на поверхности частиц носителя; г – цитопатическое действие вируса через 72 ч после заражения культуры клеток.

Заключение. Наиболее эффективным способом получения значительных количеств вируса SARS-CoV-2 представляется псевдосуспензионный метод культивирования на микроносителях. Оптимальная доза заражения 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл. при 2 г/л микроносителей и 100-150 млн. кл./л .