DOI: 10.15593/2224-9400/2018.4.07
УДК 57.578

Е.А. Нечаева, И.Ф. Радаева, Н.Б. Думченко, Т.П. Сумкина, М.П. Богрянцева, Т.Ю. Сенькина

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово, Новосибирская область, Россия

БЕССЫВОРОТОЧНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ВИРУСОВ

При создании и производстве вирусных вакцин используют питательные среды с добавлением сыворотки крови животных. Сыворотка, как продукт животного происхождения, остается неизученным комплексом различных компонентов, создает нестандартные условия для роста и размножения клеток и вирусов. В связи с этим в последние годы ведутся активные исследования по конструированию бессывороточных синтетических питательных сред. Использование бессывороточной среды для культивирования клеток и вирусов позволяет сделать процесс получения вакцин более контролируемым и значительно уменьшить риск контаминации.

На основе базового компонентного состава, применяемого для получения питательной среды Игла МЕМ, авторами разработана бессывороточная питательная среда «ВекторВак-ПС1». Бессывороточная питательная среда представляет собой растворенную в очищенной воде смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, микроэлементов, индикатора фенолового красного и других компонентов. Питательная среда стерильна, свободна от животных и растительных компонентов, имеет постоянный состав с четко определенными ингредиентами, не содержит антибиотиков и консервантов.

Исследованы биологические свойства бессывороточной питательной среды. Показано, что жизнеспособность клеток на бессывороточной среде ВекторВак-ПС1 сопоставима с коммерческой бессывороточной средой SFM4MegaVir и превосходит среду Игла МЕМ. Бессывороточная питательная среда ВекторВак-ПС1 при культивировании обеспечивает рост клеток, клетки имеют типичную для данной культуры морфологию, формируют монослой на вторые-третьи сутки роста, сохраняют высокую пролиферативную активность. Продукция вакцинного штамма Л-16 вируса кори и вакцинных штаммов А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), А/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и В/60/Пхукет/2013/26 вируса гриппа в культуре клеток в бессывороточной среде ВекторВак-ПС1 сравнима с продукцией вирусов в среде SFM4MegaVir.

Бессывороточная питательная среда ВекторВак-ПС1 пригодна для культивирования клеток и вирусов, может быть использована при получении вакцинных препаратов.

Ключевые слова: *бессывороточная питательная среда, культура клеток, вакцинные штаммы вируса кори и гриппа, вакцины.*

E.A. Nechaeva, I.F. Radaeva, N.B. Dumchenko, T.P. Sumkina, M.P. Bogryantseva, T.Yu. Senkina

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector"
of the Federal Service for Surveillance
in Consumer Rights Protection and Human Well-being,
Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

SERUM FREE MEDIUM FOR CULTIVATION OF CELLS AND VIRUSES

When creating and producing viral vaccines, nutrient media with the addition of animal blood serum are used. Serum, as a product of animal origin, remains unexplored complex of various components, creates non-standard conditions for the growth and reproduction of cells and viruses. In this regard, in recent years, active research has been conducted on the design of non-whey synthetic nutrient media. The use of serum free medium for cultivation of cells and viruses allows you to make the process of receiving vaccines in a more controlled and significantly reduce the risk of contamination.

On the basis of component composition used for the production of a nutrient medium Needle MEM, the authors have developed a serum free nutrient medium "VectorVac-PS1". The whey-free nutrient medium is a mixture of inorganic salts, amino acids, vitamins, glucose, microelements, phenolic red indicator and other components dissolved in purified water. The nutrient medium is sterile, free from animal and plant components, has a constant composition with well-defined ingredients, does not contain antibiotics and preservatives.

The biological properties of the culture medium are investigated. It is shown that the viability of cells in the serum-free medium VectorVac-PS1 is comparable to the commercial serum-free medium SFM4MegaVir and exceeds the medium Needle MEME. Serum free nutrient medium VectorVac-PS1 by cultivating ensures the growth of cells, cells have characteristic culture morphology, a monolayer is formed at 2-3 days growth, maintain a high proliferative activity. The production of vaccine strains L-16 of measles virus and vaccine strains A/17/California/2009/38 (H1N1), A/17/Switzerland/2010/1 (H3N2) and B/60/Phuket/2013 / 26 of influenza virus in cell culture in a serum-free environment VectorVac-PS1 is comparable to the production of viruses in the environment SFM4MegaVir.

The serum-free nutrient medium VectorVac-PS1 is suitable for the cultivation of cells and viruses, can be used in the preparation of vaccines.

Keywords: *serum-free medium, cell culture, vaccine strains of measles and influenza virus, vaccines.*

При создании и производстве вирусных вакцин в качестве субстратов используют культуры клеток. Необходимым компонентом для культивирования клеток является синтетическая питательная среда и сыворотка крови животных. Питательная среда имеет определенный химический состав. Сыворотка, как продукт животного происхожде-

ния, остается неизученным комплексом различных компонентов, создает нестандартные условия для роста и размножения клеток и вирусов. Кроме того, существуют проблемы, связанные с потенциальной возможностью контаминации сыворотки бактериями, грибами, микоплазмами, вирусами, возбудителями трансмиссивной губчатой энцефалопатии. При использовании сыворотки велика вероятность попадания пирогенов и остаточных элементов сыворотки в конечный продукт [1]. В связи с этим в последние годы ведутся активные исследования по конструированию бессывороточных синтетических питательных сред (БС).

БС имеют определенные преимущества, они улучшают воспроизводимость результатов вследствие большей стабильности состава среды и облегчают очистку конечного продукта. Использование БС для культивирования клеток и вирусов позволяет сделать процесс получения вакцин более контролируемым и значительно уменьшить риск контаминации. Идеальная БС должна иметь определенный химический состав, поддерживать рост различных видов клеток [2–6]. Однако универсальной БС не существует. Поэтому для каждого типа клеток разрабатываются специальные среды. Состав используемой питательной среды является фактором, оказывающим огромное влияние на клеточный метаболизм и, следовательно, на выход вируса. Если состав базовых (основных) вирусологических питательных сред (MEM, DMEM, 199, F-12, RPMI, 199 и др.) известен и приводится в каталогах большинства коммерческих компаний, то прописи специализированных БС являются предметом собственности компаний (Gibco, JRHbiosciences, HyClone, др.) и недоступны для широкого использования. Подходы к созданию БС типичны. К известной базовой питательной среде добавляют различные компоненты, в том числе смесь аминокислот, неорганических соединений, микро- и макроэлементов, сахаров, жирных кислот, инсулина, трансферрина и т.д. [2–6]. Однако комбинация, процентный состав компонентов различны, в связи с чем различны как ростовые свойства сред, так и их стоимость. Авторами разработана БС ВекторВак-ПС1 определенного химического состава для культивирования клеток MDCK и Vero и вакцинных штаммов вирусов кори и гриппа [7].

Цель данного исследования – определение пригодности БС ВекторВак-ПС1 для культивирования клеток и вирусов.

Экспериментальная часть. В работе использовали вакцинный штамм вируса кори Ленинград-16 (Л-16) из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и вакцинные штаммы вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), A/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26, полученные из НИИ экспериментальной медицины (г. Санкт-Петербург).

В качестве клеточного субстрата применяли перевиваемые культуры клеток MDCK (почка взрослой самки коккер-спаниеля) и Vero (почка зеленой мартышки) из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для культивирования клеток использовали питательные среды: Игла МЕМ, БС ВекторВак-ПС1 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и коммерческую БС SFM4MegaVir (HyClone, США). Клетки культивировали в питательных средах как с добавлением 1 или 5 % сыворотки крови плодов коровы (Gibco, США), так и без сыворотки.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [8]. Культуру клеток MDCK в концентрации $5 \cdot 10^3$ в 100 мкл среды Игла МЕМ, содержащей 5 % сыворотки крови плодов коровы, помещали в 96-луночный планшет (Costar, США) и инкубировали 24 ч при 37 °С в CO^2-инкубаторе. После прикрепления клеток к подложке проводили смену среды на перечисленные выше питательные среды, клетки инкубировали в течение 48 ч при тех же условиях. В лунки вносили по 5 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (Sigma, США), инкубировали 4 ч. По окончании инкубации добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (Вектон, Россия) и определяли жизнеспособность клеток по интенсивности окраски раствора формазана, измеряя его оптическую плотность в лунках на микропланшетном ридере Tecan Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 492 нм.

Сравнительное изучение пролиферативной активности клеток MDCK проводили при культивировании на различных питательных средах с добавлением и без добавления сыворотки. Клетки культивировали во флаконах вместимостью 250 мл (TPP, Швейцария). Посевная концентрация составляла $1{,}0 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл, кратность рассева 1:3 – 1:4. Для пересева культур клеток в качестве диспергента применяли 0,25%-ный раствор трипсина и 0,02%-ный раствор Версена (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) в соотношении 1:2. Культуры клеток инкубировали при температуре 37 °С в течение 72–96 ч. Оцени-

вали морфологию клеток, индекс пролиферации, сроки формирования и состояние клеточного слоя [9].

Для определения сроков сохранения клеток на подложке культуру выращивали в ростовой питательной среде Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки крови плодов коровы. После образования монослоя ростовую среду удаляли, монослой отмывали средой Игла МЕМ без сыворотки и вносили среду SFM4MegaVir или БС ВекторВак-ПС1. Через каждые 3–4 сут питательную среду удаляли и заменяли ее на свежую порцию среды. Ежедневно при помощи инвертированного микроскопа оценивали состояние клеточного слоя.

Продукцию вакцинного штамма Л-16 вируса кори в клетках Vero исследовали в БС ВекторВак-ПС1 и среде SFM4MegaVir. Культуру клеток культивировали в 96-луночных планшетах, в качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла МЕМ с 5 % сыворотки крови плодов коровы. После прикрепления клеток к подложке ростовую среду сливали, монослой освобождали от балластных белков путем шестикратных отмывок питательной средой, затем клетки заражали вакцинным штаммом вируса кори Л-16 с множественностью заражения 0,001–0,0001 $ТЦД_{50}$/0,5 мл и далее продолжали культивирование клеток в БС SFM4MegaVir или БС ВекторВак-ПС1. На восьмые сутки проводили учет специфической активности вируса кори по цитопатическому действию [10].

Продукцию вакцинных штаммов вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), A/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 исследовали в БС ВекторВак-ПС1 и среде SFM4MegaVir. Культуру клеток культивировали в 96-луночных планшетах, в качестве ростовой питательной среды использовали среду Игла МЕМ с 5 % сыворотки крови плодов коровы. После прикрепления клеток к подложке ростовую среду сливали, монослой освобождали от балластных белков путем шестикратных отмывок питательной средой, затем клетки заражали вакцинными штаммами вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), A/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 с множественностью заражения 0,01-0,001 $ЭИД_{50}$/0,5 мл и далее продолжали культивирование клеток в БС SFM4MegaVir или БС ВекторВак-ПС1. На третьи сутки проводили учет специфической активности вируса гриппа по цитопатическому действию [11].

Математическую обработку результатов исследований проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента [12].

Результаты и обсуждение. На основе базового компонентного состава, применяемого для получения питательной среды Игла МЕМ, разработана БС ВекторВак-ПС1 [7].

БС ВекторВак-ПС1 жидкая представляет собой растворенную в очищенной воде смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, микроэлементов, индикатора фенолового красного и других компонентов. БС – прозрачная жидкость красновато-оранжевого цвета без опалесцирующего осадка, pH среды варьирует от 7,1 до 7,5, буферная емкость не менее 3,0 мл, содержание хлор-ионов колеблется в пределах 4,60–5,62 г/л, глюкозы от 3,0 до 5,1 г/л, количество аминного азота не менее 0,08 г/л. Питательная среда стерильна, свободна от животных и растительных компонентов, имеет постоянный состав с четко определенными ингредиентами, не содержит антибиотиков и консервантов.

Исследованы биологические свойства БС ВекторВак-ПС1 для клеток MDCK. В качестве контроля сравнения применяли питательную среду Игла МЕМ и коммерческую SFM4MegaVir, используемую в производстве вирусных вакцин.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. МТТ-тест основан на ферментном восстановлении неокрашенной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиозол-2-ил]-2,5-дифенилтетрозолия бромид, МТТ) в живых метаболически активных клетках с образованием голубых кристаллов формазана. Нежизнеспособные, мертвые клетки такой способностью не обладают. Чем больше клеток в культуре, чем они более жизнеспособны, тем больше образуется кристаллов формазана и тем больше значение оптической плотности субстрата [8]. В табл. 1 представлены результаты измерения оптической плотности клеток MDCK, культивируемых на различных питательных средах. Показано, что жизнеспособность клеток на БС ВекторВак-ПС1 сравнима с коммерческой БС SFM4 MegaVir и превосходит среду Игла МЕМ (подтверждена статистически значимая разница).

Проведена оценка пролиферативной активности клеток MDCK, культивируемых в средах с добавлением и без добавления сыворотки крови плодов коровы (табл. 2).

Таблица 1

Зависимость оптической плотности клеточного субстрата от состава питательной среды

Питательная среда	Сыворотка, %	Оптическая плотность субстрата ($x \pm \sigma$)
Игла МЕМ	5	1,9 ± 0,1
	1	1,8 ± 0,1
	0	1,3 ± 0,2
БС SFM4MegaVir	5	2,3 ± 0,1
	1	2,4 ± 0,2
	0	2,4 ± 0,2
БС ВекторВак-ПС1	5	2,3 ± 0,1
	1	2,2 ± 0,1
	0	2,3 ± 0,2

Таблица 2

Значения индекса пролиферации клеток MDCK, пассируемых на различных питательных средах

Питательная среда	Сыворотка, %	Индекс пролиферации клеток ($x \pm \sigma$)
Игла МЕМ	5	4,3 ± 0,4
	1	4,0 ± 0,3
	0	–
БС SFM4MegaVir	5	2,4 ± 0,2
	1	2,4 ± 0,2
	0	2,0 ± 0,5
БС ВекторВак-ПС1	5	4,9 ± 0,2
	1	4,0 ± 0,3
	0	3,2 ± 0,1

При культивировании в питательных средах Игла МЕМ и БС ВекторВак-ПС1 с добавлением 5 и 1 % сыворотки ростовая активность клеток MDCK сопоставима, индекс пролиферации после 1-го пассажа составляет 4,0–4,9. Клетки формируют монослой на вторые-третьи сутки роста, монослой состоит из эпителиоподобных клеток с крупными ядрами овальной или круглой формы, в ядре от 1 до 5 ядрышек, цитоплазма мелкозернистая.

При культивировании в среде SFM4 MegaVir с добавлением 5 и 1 % сыворотки наблюдается изменение морфологии клеток, клетки увеличиваются в размерах, цитоплазма ячеистая с темными включениями, клетки образуют тяжи, пролиферативная активность культуры снижена.

Культура клеток MDCK, пассируемая на питательных средах Игла МЕМ без добавления сыворотки, монослой не образовывала, клетки оседали, но не прикреплялись к подложке, при этом наблюдались единичные распластанные и делящиеся клетки, процесс пролиферации отсутствовал. В то же время использование питательной среды SFM4MegaVir хотя и приводило к изменению морфологии культуры клеток, монослой был представлен тяжами крупных распластанных на подложке клетках, пролиферативная активность которых составляла 2,0.

БС ВекторВак-ПС1 при культивировании клеток MDCK обеспечивает рост клеток, клетки имеют типичную для данной культуры морфологию, формируют монослой на вторые-третьи сутки роста, сохраняют высокую пролиферативную активность (индекс пролиферации культуры клеток составляет 3,2).

Таким образом, питательные среды SFM4MegaVir и БС ВекторВак-ПС1 без добавления сыворотки могут быть использованы в качестве поддерживающей среды и для наработки клеток MDCK в течение одного пассажа для последующего получения вакцины.

Поскольку культуру клеток MDCK применяют в качестве субстрата при получении вакцин, а сбор вируссодержащей жидкости проводят многократно каждые 3 сут до тех пор, пока на поверхности подложки сохраняется до 50 % клеток, нами были проведены исследования по определению длительности сохранения монослоя. Клетки выращивали в питательной среде Игла МЕМ с добавлением сыворотки, после образования монослоя через каждые 3 сут проводили смену среды на SFM4 MegaVir или БС ВекторВак-ПС1. В процессе работы было получено 7 сливов. Длительность сохранения монослоя клеток MDCK на подложке была одинаковой как для среды SFM4MegaVir, так и для БС ВекторВак-ПС1 и составляла 25 сут. При этом морфология клеток не изменялась для БС ВекторВак-ПС1, в то время как на среде SFM4 MegaVir клетки увеличивались в размерах и образовывали тяжи.

В процессе работы определяли продукцию вакцинного штамма Л-16 вируса кори в клетках Vero (табл. 3). В результате проведенных исследований было показано, что продукция вируса кори в культуре клеток в БС ВекторВак-ПС1 была сравнима с продукцией вируса в среде SFM4MegaVir и среде Игла МЕМ, содержащей 5 % сыворотки крови плодов коровы.

Таблица 3

Продукция вакцинного штамма вируса кори
в культуре клеток Vero

Поддерживающая питательная среда	Специфическая активность вируса кори, $ТЦД_{50}$/0,5 мл ($x \pm \sigma$)
Игла МЕМ + 5 % сыворотки	6,2 ± 0,5
БС SFM4MegaVir	5,9 ± 0,5
БС ВекторВак-ПС1	6,2 ± 0,5

Исследовали продукцию вакцинных штаммов вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), А/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и В/60/Пхукет/2013/26 в клетках MDCK (табл. 4). Показано, что продукция штаммов вируса гриппа в культуре клеток в БС ВекторВак-ПС1 была сравнима с продукцией вируса в среде SFM4MegaVir.

Таблица 4

Продукция вакцинного штамма вируса гриппа
в культуре клеток MDCK

Поддерживающая питательная среда	Специфическая активность вируса гриппа, lg $ЭИД_{50}$/0,5 мл ($x \pm \sigma$)		
	А/17/Калифорния /2009/38 (H1N1)	А/17/Швейцария /2010/1 (H3N2)	В/60/Пхукет /2013/26
Игла МЕМ + 5 % сыворотки	7,0±0,5	6,3±0,5	6,0±0,5
БС SFM4MegaVir	9,0±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5
ВекторВак-ПС1	9,0±0,5	9,0±0,5	8,0±0,5

Таким образом, в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана БС ВекторВак-ПС1 [7]. Показано, что жизнеспособность клеток на БС ВекторВак-ПС1 сравнима с коммерческой БС SFM4MegaVir и превосходит среду Игла МЕМ. Питательная среда ВекторВак-ПС1 при культивировании клеток MDCK обеспечивает рост клеток, клетки имеют типичную для данной культуры морфологию, сохраняют высокую пролиферативную активность. Продукция вакцинного штамма Л-16 вируса кори и вакцинных штаммов А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1), А/17/Швейцария/2010/1 (H3N2) и В/60/Пхукет/2013/26 вируса гриппа в культуре клеток в БС ВекторВак-ПС1 сравнима с продукцией вирусов в среде SFM4MegaVir и среде Игла МЕМ, содержащей 5 % сыворотки крови плодов коровы.

БС ВекторВак-ПС1 пригодна для культивирования клеток и вирусов, может быть использована при получении вакцинных препаратов.

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-14/16.

Список литературы

1. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток Vero / Г.П. Трошкова, Л.Д. Мартынец, Е.В. Кирова, Т.П. Сумкина, А.В. Юдин // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 5. – С. 94–94.

2. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses / O.-W. Merten, H. Kallel, J.-C. Manuguerra, M. Tardy-Panit, R. Crainic, F. Delpeyroux, S. Van der Werf, P. Perrin // Cytotechnology. – 1999. – Vol. 30. – P. 191–201.

3. Merten O.-W., Wu R., Couve R. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactor // Cytotechnology. – 1997. – Vol. 25. – P. 35–41.

4. Среда, не содержащая белков и сыворотки, и способ культивирования клеток млекопитающих в такой среде: пат. 2380412 RU / М. Райтер, В. Мундт, Ф. Дорнер, Л. Грилльбергер. Опубл. 27.01.2010.

5. Efficient and effective supplement screening for the development of chemically defined media in cell culture: Patent USA US2010/0129727 / P. Hossler, C. Racicot, S. McDermott, J. Fann. – 2012.

6. Kallel H., Perrin P., Merten O.-W. Evaluations of the new medium (MDSS2N) free of serum and animal proteins, for the production of biological // New Development and New Applications in Animal Cell Technology. – Kluwer Academic Publishers, 1998. – P. 561–568.

7. ТУ 20.59.52-083-05664012–2018. Питательная среда для культур клеток бессывороточная жидкая ВекторВак-ПС1. – М., 2018.

8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of Immunological Methods. – 1983. – Vol. 65 (1–2). – P. 55–63.

9. ОФС.1.7.2.0011.15. Требования к клеточным культурам-субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов / Гос. фармакопея 13. – 2015. – Т. 2. – С. 672–688.

10. ФС.3.3.1.0032.15. Вакцина коревая культуральная живая / Гос. фармакопея 13. – 2015. – Т. 3. – С. 1061–1294.

11. ФС.3.3.1.0027.15. Вакцина гриппозная живая / Гос. фармакопея 13. – 2015. – Т. 3. – С. 993–1008.

12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.

References

1. Troshkova G.P., Martynets L.D., Kirova E.V., Sumkina T.P., Iudin A.V. Bessyvorotochnaia pitatel'naia sreda dlia kul'tivirovaniia kletok Vero [Serum-free culture medium for culturing Vero cells]. *Fundamental'nye issledovaniia*, 2005, no. 5, pp. 94-94.

2. Merten O.-W., Kallel H., Manuguerra J.-C.,Tardy-Panit M., Crainic R., Delpeyroux F., Van der Werf S., Perrin P. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnology*, 1999, vol. 30, pp. 191-201.

3. Merten O.-W., Wu R., Couve R. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactor. Cytotechnology, 1997, vol. 25, pp. 35-41.

4. Raiter M., Mundt V., Dorner F., Grill'berger L. Sreda, ne soderzhashchaia belkov i syvorotki, i sposob kul'tivirovaniia kletok mlekopitaiushchikh v takoi srede [Medium, not containing proteins and serum, and the method of cultivation of mammalian cells in such an environment]. Patent Rossiiskaia Federatsiia no. 238412 (2010).

5. Hossler P., Racicot C., McDermott S., Fann J. Efficient and effective supplement screening for the development of chemically defined media in cell culture: Patent USA US2010/0129727 (2012).

6. Kallel H., Perrin P., Merten O.-W. Evaluations of the new medium (MDSS2N) free of serum and animal proteins, for the production of biological. In: New Development and New Applications in Animal Cell Technology. Kluwer Academic Publishers, 1998, pp. 561-568.

7. Tekhnicheskie usloviia № 20.59.52-083-05664012-2018 Pitatel'naia sreda dlia kul'tur kletok bessyvorotochnaia zhidkaia VektorVak-PS1 [Nutrient medium for cell cultures of serum-free liquid VectorVak-PS1].

8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, vol. 65 (1–2), pp. 55-63.

9. Farmakopeinaia stat'ia OFS.1.7.2.0011.15 Trebovaniia k kletochnym kul'turam-substratam proizvodstva immunobiologicheskikh lekarstvennykh preparatov [Requirements for cell cultures-substrates for the production of immunobiological drugs]. *Gosudarstvennaia Farmakopeia 13*, 2015, vol. 2, pp. 672-688.

10. Farmakopeinaia stat'ia FS.3.3.1.0032.15 Vaktsina korevaia kul'tural'naia zhivaia [Vaccine measles culture live]. *Gosudarstvennaia Farmakopeia 13*, 2015, vol. 3, pp. 1061-1294.

11. Farmakopeinaia stat'ia FS.3.3.1.0027.15 Vaktsina grippoznaia zhivaia [Live influenza vaccine]. *Gosudarstvennaia Farmakopeia 13*, 2015, vol. 3, pp. 993-1008.

12. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniiakh [Statistical methods in microbiological research]. Leningrad, Medgiz, 1962, 180 p.

Получено 12.10.2018

Об авторах

Нечаева Елена Августовна (Кольцово, Россия) – кандидат медицинских наук, заместитель директора по научной и производственной работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, e-mail: nechaeva@vector.nsc.ru).

Радаева Ирина Федоровна (Кольцово, Россия) – заведующая лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, e-mail: radaeva@vector.nsc.ru).

Думченко Наталья Борисовна (Кольцово, Россия) – научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, e-mail: dumchenko@vector.nsc.ru).

Сумкина Татьяна Петровна (Кольцово, Россия) – заведующая лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, e-mail: sumkina@vector.ngs.ru).

Богрянцева Марина Поликарповна (Кольцово, Россия) – кандидат биологических наук заведующая ОБТК ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, e-mail: bogryantseva@vector.nsc.ru).

Сенькина Татьяна Юрьевна (Кольцово, Россия) – заведующая лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, e-mail: senkina@vector.nsc.ru).

About the author

Elena A. Nechaeva (Koltsovo, Russian Federation) – Ph.D. of Medical Sciences, Deputy Director for Research and Production Work of FBRI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor (630559, Koltsovo, Novosibirsk region, e-mail: nechaeva@vector.nsc.ru).

Irina F. Radaeva (Koltsovo, Russian Federation) – Head of the laboratory of FBRI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor (630559, Koltsovo, Novosibirsk region, e-mail: radaeva@vector.nsc.ru).

Natalya B. Dumchenko (Koltsovo, Russian Federation) – Researcher of FBRI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor (630559, Koltsovo, Novosibirsk region, e-mail: dumchenko@vector.nsc.ru).

Tatyana P. Sumkina (Koltsovo, Russian Federation) – Head of the laboratory of FBRI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor (630559, Koltsovo, Novosibirsk region, e-mail: sumkina@vector.ngs.ru).

Marina P. Bogryantseva (Koltsovo, Russian Federation) – Ph.D. in Biology Sciences, of FBRI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor (630559, Koltsovo, Novosibirsk region, e-mail: bogryantseva@vector.nsc.ru).

Tatiana Yu. Senkina (Koltsovo, Russian Federation) – Head of the laboratory of FBRI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor (630559, Koltsovo, Novosibirsk region, e-mail: senkina@vector.nsc.ru).