

БИОЛОГИЯ**BIOLOGY**

УДК 578.4; 579.62; 57.083.24

*Алиева Алина Бейсеновна,
магистр биологических наук, научный сотрудник, НИИПББ КН МОН РК*

*Алиева Алина Бейсеновна,
биология илимдеринин магистри,
КР ӨКМнин РИБСП КН илимий кызматкери
Alieva Alina Beisenovna,
Master of Biological Sciences, Researcher, RIBSP KN MES RK*

*Айдарбекова Динара Болатовна,
лаборант, НИИПББ КН МОН РК
Айдарбекова Динара Болатовна,
лаборант, КР ӨКМнин РИБСП КН
Aidarbekova Dinara Bolatovna,
laboratory assistant, RIBSP KN MES RK*

*Алимбай Нурбол Эрболович,
лаборант, НИИПББ КН МОН РК
Алимбай Нурбол Эрболович,
лаборант, КР ӨКМнин РИБСП КН
Alimbay Nurbol Erbolovich,
laboratory assistant, RIBSP KN MES RK*

*Кенжебаева Маржан Кульбековна,
магистр биологических наук,
старший лаборант, НИИПББ КН МОН РК
Кенжебаева Маржан Кульбековна,
биология илимдеринин магистри,
КР ӨКМнин РИБСП КН улук лаборанты
Kenzhebaeva Marzhan Kulbekovna,
Master of Biological Sciences,
Senior Laboratory Assistant, RIBSP KN MES RK*

*Табыс Шалкар Толегенулы,
лаборант, НИИПББ КН МОН РК
Табыс Шалкар Толегенулы,
лаборанты, РИБСП КН КР ӨКМ
Tabys Shalkar Tolegenuly,
laboratory assistant, RIBSP KN MES RK*

*Сәрсенқұлова Нурай Алибекқызы,
магистр биологических наук,
старший лаборант, НИИПББ КН МОН РК,*

Сарсенкулова Нурай Алибеккызы,
биология илимдеринин магистри,
КР ӨКМнин РИБСП КН улук лаборанты
Sarsenqylova Nuray Alibekkyzy,
Master of Biological Sciences,
Senior Laboratory Assistant, RIBSP KN MES RK

Сылдырбаева Анар Сабетхаткызы,
старший лаборант, НИИПББ КН МОН РК
Сылдырбаева Анар Сабетхат кызы,
КР ӨКМнин РИБСП КН улук лаборанты,
Syldyrbayeva Anar Sabetkhatkyzy,
senior laboratory assistant, RIBSP KN MES RK

Жугунисов Куандык Даулетбаевич,
PhD, заведующий лабораторией,
НИИПББ КН МОН РК
Жугунисов Куандык Даулетбаевич,
медицина илимдеринин кандидаты,
лабораториянын баишчысы,
КР ӨКМнин РИБСП КН
Zhugunisov Kuandyk Dauletbayevich,
PhD, head of the laboratory, RIBSP KN MES RK

Мамбеталиев Муратбай Альдибаевич,
кандидат ветеринарных наук, профессор,
ведущий научный сотрудник, НИИПББ КН МОН РК
Мамбеталиев Муратбай Алдибаевич,
ветеринария илимдеринин кандидаты, профессор,
КР ӨКМнин Саламаттык сактоо жана коопсуздук илим изилдөө институту
Mambetaliev Muratbai Aldibaevich,
Candidate of Veterinary Sciences, Professor,
Research Institute for Health and Safety of the KN MES RK

Баракбаев Кайнар Базаркулович,
кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторий
Баракбаев Кайнар Базаркулович,
ветеринария илимдеринин кандидаты, лаборатория баишчысы
Barakbaev Kainar Bazarkulovich,
candidate of veterinary sciences, head of laboratories

Абдураимов Ергали Орынбасарович,
кандидат ветеринарных наук, профессор,
НИИПББ КН МОН РК
Абдураимов Ергали Орынбасарович,
ветеринария илимдеринин кандидаты, профессор,
КР ӨКМнин Саламаттык сактоо жана коопсуздук илим изилдөө институту

*Abduraimov Yergali Orynbasarovich,
Candidate of Veterinary Sciences, Professor,
Research Institute for Health and Safety of the KN MES RK*

*Закарья Кунсулу Дальтоновна,
кандидат ветеринарных наук, профессор,
НИИПББ КН МОН РК*

*Zakaria Kunsulu Daltonovna,
candidate of veterinary sciences,
professor, RIBSP KN MES RK*

*Закария Кунсулу Дальтоновна,
ветеринария илимдеринин кандидаты,
профессор, КР ӨКМнин РИБСП КН*

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
п.г.т. Гвардейский, Казахстан, E-mail: unots@biosafety.kz*

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ОРТОПОКСВИРУСОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Аннотация. Изучение ортопоксвирусов интенсивно проводилось до полной ликвидации вируса натуральной оспы в 1980-х годах. Однако после 80-х годов исследования ортопоксвирусов замедлились из-за снижения их актуальности. В последние годы в связи с возникновением вирусов коровьей оспы и оспы обезьян не только в популяциях животных, но и среди людей изучение ортопоксвирусов стало более актуальным.

По результатам ранее проведенных исследований известно, что некоторые противоспешенные вакцины успешно применены для ликвидации натуральной оспы, хотя в большинстве случаев безопасность вакцин до сих пор беспокоила многих вирусологов. Основная причина заключалась в том, что вакцина была приготовлена из тканей животных и многие исследователи-вирусологи решили использовать клеточные культуры при культивировании вирусов. Однако на сегодняшний день решение этой проблемы до сих пор остается открытым. В связи с этим в данной статье представлены результаты определения некоторых культуральных свойств коллекционных штаммов ортопоксвирусов.

В результате проведенных исследований установлено, что вирусы осповакцины (ВОВ) и коровьей оспы (ВОК) беспрепятственно репродуцируются в клетках почки ягнёнка (ПЯ) и в клетках почки африканской зеленой мартышки (Vero). При этом цитопатическое действие (ЦПД) вируса на клеточный монослой происходило быстро, и срок культивирования вируса сократилось со 120 ч до 24 ч, а биологическая активность осталась неизменной и составила для штамма ВОК $5,10 \pm 0,10 \text{ lgTЦД}_{50}/\text{см}^3$, для штамма ВОВ $5,15 \pm 0,11 \text{ lgTЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Последовательное пассирование вирусов в данных системах культивирования не привело к существенно значимому изменению биологической активности получаемого вирусосодержащего материала. Полученные результаты этих исследований являются первичными неполными данными о культуральных свойствах этих штаммов вируса.

Ключевые слова: вирус оспы коров, вирус осповакцины, штаммы, культура клеток, биологическая активность, пассаж.

КЛЕТКА КУЛЬТУРАЛАРЫНДА ОРТОПОКСВИРУСТАРДЫН КОЛЛЕКЦИЯЛЫК ШТАММДАРЫН ӨСТҮРҮҮ

Аннотация. Ортопоксвирустарды изилдөө 1980-жылдары вариола вирусун жок кылганга чейин интенсивдүү түрдө жүргүзүлгөн. Бирок 1980-жылдардан кийин ортопоксвирустар боюнча изилдөө актуалдуулугунун төмөндөшүнөн улам басаңдаган. Акыркы жылдары уй чечек жана маймыл чечек вирустарынын жаныбарлар популяциясында гана эмес, адамдар арасында да пайда болушуна байланыштуу ортопоксвирустарды изилдөө актуалдуу болуп калды.

Чечекке каршы кээ бир вакциналар чечекти жок кылуу үчүн ийгиликтүү колдонулгандыгы мурунку изилдөөлөрдөн белгилүү, бирок көпчүлүк учурларда вакциналардын коопсуздугу ушул убакка чейин көптөгөн вирусологдорду тынчсыздандырып келген. Негизги себеби, вакцина жаныбарлардын ткандарынан жасалган жана көптөгөн вирусологдор вирустарды өстүрүүдө клетка культурасын колдонууну чечишкен. Бирок, бүгүнкү күнгө чейин бул маселени чечүү жолдору ачык бойдон калууда. Ушуга байланыштуу бул макалада ортопоксвирустардын коллекциялык штаммдарынын кээ бир культуралдык касиеттерин аныктоонун натыйжалары берилген.

Изилдөөлөрдүн натыйжасында козунун бөйрөк клеткаларында жана африкалык жашыл маймылдын (Vero) бөйрөк клеткаларында vaccinia вирустары жана уй чечек эркин көбөйө тургандыгы аныкталган. Мында вирустун клетканын бир катмарына цитопатиялык таасири (CPE) тез эле пайда болуп, вирусту өстүрүүнүн мөөнөтү 120 сааттан 24 саатка чейин кыскарган, ал эми биологиялык активдүүлүк өзгөрүүсүз калып, Уй чечек вирусунун штаммы үчүн $5,10 \pm 0,10 \text{ lgTCID}_{50}$, vaccinia вирустары үчүн $5,15 \pm 0,11 \text{ lgTCD}_{50}/\text{cm}^3$ түздү.

Бул өстүрүү системаларында вирустардын ырааттуу өтүшү алынган вирусту камтыган материалдын биологиялык активдүүлүгүнүн олуттуу өзгөрүшүнө алып келген жок. Бул изилдөөлөрдүн натыйжалары вирустун бул штаммдарынын культуралдык касиеттери боюнча алгачкы толук эмес маалыматтар.

Негизги сөздөр: уй чечек вирусу, вакцина вирусу, штаммдар, клетка культурасы, биологиялык активдүүлүк, өтүү.

CULTIVATION OF COLLECTION STRAINS OF ORTHOPOXVIRUSES IN CELL CULTURES

Abstract. The study of orthopoxviruses was steadfastly pursued until the complete disappearance of the variola virus in the 1980s. However, after the 1980s, research on orthopoxviruses slowed down due to their beautiful relevance. In recent years, in connection with the detection of cowpox and monkeypox viruses, not only in animal populations, but also among humans, the study of orthopoxviruses has become more relevant.

It is known from earlier studies that some smallpox vaccines have been successfully used to eradicate smallpox, although in most cases the safety of the vaccines has so far been of concern to many virologists. The main reason was that the vaccine was made from animal tissues and many virologists decided to use cell cultures when cultivating viruses. However, to date, the solution to this problem is still open. In this regard, this article presents the results of determining some of the cultural properties of collection strains of orthopoxviruses.

As a result of the studies, it was found that vaccinia viruses (VAV) and cowpox (VOK) reproduce freely in the cells of the kidney of the lamb (LA) and in the cells of the kidney of the African green monkey (Vero). At the same time, the cytopathic effect (CPE) of the virus on the cell monolayer occurred quickly, and the period of virus cultivation was reduced from 120 h to 24 h, while the biological activity remained unchanged and amounted to $5.100.10 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ for the WOK strain, for the WOV strain $5.15 \pm 0.10 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ for the WOK strain, for the WOV strain $5.15 \pm 0.11 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$.

Sequential passaging of viruses in these culture systems did not lead to a significant change in the biological activity of the obtained virus-containing material. The results of these studies are primary incomplete data on the cultural properties of these strains of the virus.

Key words: cowpox virus, vaccinia virus, strains, cell culture, biological activity, passage.

Введение. Оспа коров (*Variola vaccina*) – контагиозная вирусная болезнь многих других видов млекопитающих, в том числе крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой и папулезно-пустулезной сыпью на коже и слизистых оболочках. В естественных условиях, кроме коров, к вирусу восприимчивы лошади, мулы, буйволы, ослы, верблюды, кролики и человек. Болезнь особенно быстро распространяется при совместном содержании больных и здоровых животных, заболеваемость может достигать 100% [1].

В доступной литературе нет информации, относящейся к количественной оценке степени чувствительности людей к вирусу оспы коров и частота встречаемости данной инфекции. Но, циркуляция ортопоксвирусов среди диких и домашних животных была зарегистрирована в разные годы в различных регионах мира, включая Южную Америку, Африку, Европу, Ближний Восток и Азию [2-4]. В странах Европы за последние десятилетие неоднократно отмечались зарегистрированные случаи заболевания людей оспой коров [5]. 2008-2009 гг. беспрецедентная вспышка у людей отмечалась во Франции и Германии [6, 7], обусловленная передачей вируса от инфицированных домашних крыс.

В литературе также имеются данные, что в 1970 г. в западной и центральной Африке были обнаружены 45 случаев новой болезни человека, клинически напоминающей оспу. Существует ряд причин возобновления оспенных вирусов, опасных для жизни человечества, животные-носители, в том числе не исключение и особое внимание уделяется возможности существования животных-резервуаров оспенного вируса. Таким образом, на сегодняшний день во многих странах повторное появление или появление других ортопоксвирусов в популяциях людей и животных является акту-

альной глобальной проблемой здравоохранения и ветеринарии. Также, очень важным моментом является разработка математических моделей для прогнозирования последствий таких событий, и оценка эффективности возможных противоэпидемических мероприятий [8].

Сотрудниками научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) обнаружены серопозитивные животные к вирусу оспы коров во время мониторинговых исследований на территории Жамбылской области (Данные не опубликованы). Это указывает на необходимость специальных усилий по разработке современных средств быстрой диагностики этиологического агента данного заболевания, поиску противовирусных препаратов и вакцинации восприимчивых животных. Вакцина помогает не только уберечь животных от вируса, но и противостоит его распространению.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы являлась определение оптимальных условий культивирования в культурах клеток коллекционных штаммов ортопоксвирусов.

Материалы и методы исследований

Штаммы вируса. В качестве объекта исследований был использован вакцинный штамм вируса осповакцины. Хранящееся в ампулах под вакуумом при температуре от минус 40°C. Информация о его генетической характеристике отсутствует. Также, в работе был использован штамм вируса оспы коров в лиофилизированном виде в ампулах, прошедший 12 пассажей в харионаллантоисной оболочке (ХАО) развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), с биологической активностью 4,45 lg ЭИД₅₀/см³.

Культуры клеток. Для проведения экспериментов использовали первично-трип-

синизированные (первичные) культуры клеток почек ягнят, перевиваемые культуры (линии) клеток почки африканской зеленой мартышки.

Перевиваемую культуру клеток ПЯ поддерживали и размножали для опытов путём периодических пересевов с использованием 0,02% раствора версена безцентрифужным методом. Длительное хранение наиболее часто используемых перевиваемых клеточных линий осуществляли в жидком азоте при температуре минус 196 °С.

При работе в качестве ростовых и поддерживающих сред использовали полусинтетическую среду для пристеночного культивирования клеток (ПСП) для культур клеток ПЯ и среду Игла для культуры клеток Vero, при этом рН готовых поддерживающих сред должен быть 7,2-7,6.

Отработка оптимальных условий культивирования штаммов ВОК в культурах клеток. При выборе чувствительной культуры клеток для культивирования штаммов ортопоксвирусов использовали: первично-трипсинизированную культуру клеток почки ягненка (ПЯ), и перевиваемую линию почки зеленой мартышки (Vero), выращенные в культуральных матрасах стационарным способом. Для этого культуры клеток заражали штаммами ортопоксвирусов с множественностью 0,001, 0,01, 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀/клетку на каждую дозу вируса и культивировали в течение 1-8 сут при раз-

личных температурных режимах: (33±1) °С, (35±1)°С и (37±1)°С до 80-90% поражения монослоя клеток [9].

Степень чувствительности оценивали по наличию или отсутствию цитопатической действий (ЦПД) в монослое клеток. При отсутствии цитопатических изменений или слабой их выраженности наблюдения за культурами вели в течение 10-14 сут. Титром вируса, считали наибольшее его разведение, вызывающее ЦПД в 50 % заражённых пробирок с культурой клеток. Титр вируса вычисляли по методу Reed L.J., Muench H.A. [10].

Результаты исследований

Выбор культуры клеток к ортопоксвирусу. Первым этапом наших исследований являлось изучение культуральных свойств вышеуказанных штаммов *in vitro*, включающее выбор чувствительной клеточной линии и определение оптимальных условий культивирования в ней возбудителя в зависимости от множественности инфицирующей дозы, сроков и температуры культивирования.

При выборе чувствительной клеточной линии для размножения штаммов ортопоксвирусов были испытаны культуры клеток ПЯ, Vero, выращенные в матрасах. Первые признаки ЦПД вирусов в культурах клеток в виде округлых клеток отмечали на 22-25 ч после инокуляции. Результаты исследования культуральных суспензий вирусов представлены на рисунках 1, 2.

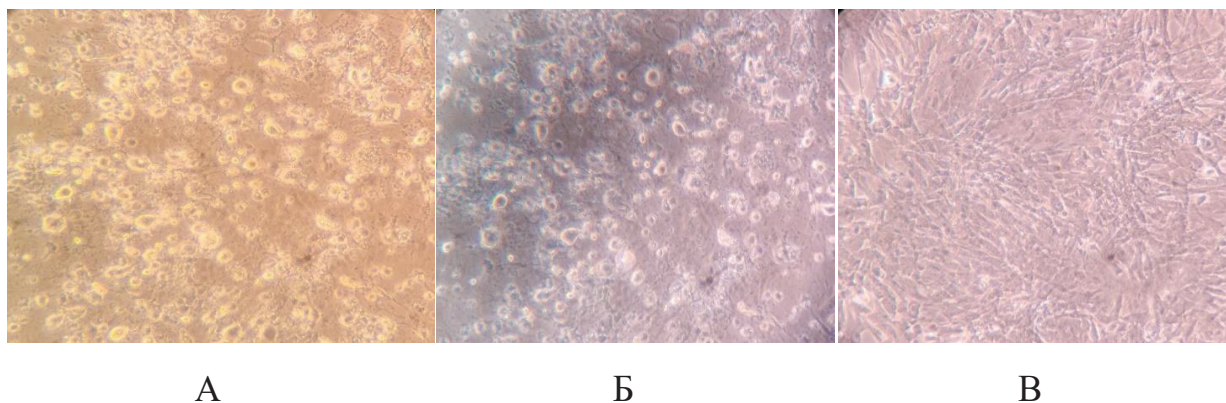


Рис. 1. (ув. х 200) А – Световая микрофотография культур клеток ПЯ зараженная штаммом ВОВ; Б – микрофотография культур клеток ПЯ инфицированная штаммом ВОК; В – неинфицированная культура клеток ПЯ

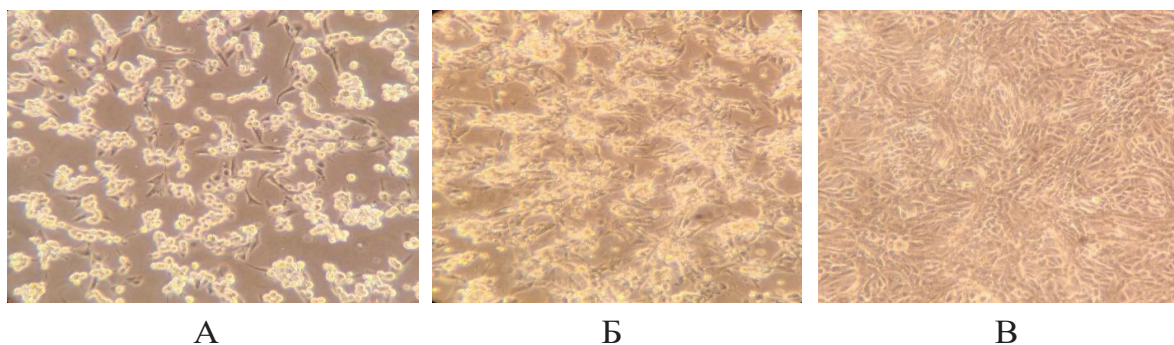


Рис. 2. (ув. $\times 200$) А – Световая микрофотография культур клеток Vero зараженная штаммом BOB; Б – микрофотография культур клеток Vero инфицированная штаммом BOK; В – неинфицированная культура клеток Vero;

Результаты экспериментов, проведённых в целях выбора клеточной линии, оптимальной для размножения штаммов, а также анализ данных литературы явились предпосылкой для изучения культуральных свойств данного штамма вируса именно в культуре клеток ПЯ, как наиболее чувствительной и эффективной системы на сегодняшний день. По литературным данным, имеются сообщения, что в процессе последовательного пассирования вируса в культуре клеток, как правило, происходят адаптационные изменения характера репродукции вируса (и некоторых других его биологиче-

ских свойств), что ведет к снижению или повышению уровня его накопления в клетках [11-13].

Пассирование штаммов в культурах клеток. Для выяснения вышеизложенного фактора изменчивости нами была изучена степень накопления ВОК и BOB в разных культурах клеток при его последовательном пассировании. Для этого была использована только высокочувствительная к вирусу линия культуры клеток. В качестве поддерживающей среды использовали ПСП.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Цитопатическая активность и накопление штаммов ортопоксвирусов при последовательных пассажах в культурах клеток

Культура клеток	Используемый вирусный материал	Пассажный уровень	Период культивирования вируса, сут	Площадь пораженного клеточного монослоя, %	Титр вируса \lg ТЦД ₅₀ /см ³ , (X \pm m)
ПЯ	Вирус оспы коров	1	4-5	90	4,00 \pm 0,07
		5	2-3	90-95	4,78 \pm 0,07
		10	2-3	90-95	5,00 \pm 0,01
		15	1-2	95-98	5,05 \pm 0,11
		20	1-2	95-98	5,10 \pm 0,10
	Вирус осповакцины	1	4-5	70-80	4,45 \pm 0,10
		3	4-5	70-80	5,00 \pm 0,10
5		3-4	80-90	5,15 \pm 0,11	
VERO	Вирус оспы коров	1	4-5	90	4,00 \pm 0,07
		5	2-3	90-95	4,78 \pm 0,07
		10	2-3	90-95	5,00 \pm 0,01
		15	1-2	95-98	5,05 \pm 0,11
		20	1-2	95-98	5,07 \pm 0,10
	Вирус осповакцины	1	4-5	70-80	4,45 \pm 0,10
		3	4-5	90-95	5,00 \pm 0,10
		5	3-4	90-95	5,10 \pm 0,11

По представленным данным таблицы 1, титры штаммов ВОК и ВОВ с 1-го по 20-е пассажи были высокими и стабильными оставались в культурах клеток ПЯ и VERO с биологической активностью $5,10 - 5,15 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $5,07 - 5,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно, не имея тенденции к снижению. Повышенная степень накопления вируса в процессе последовательного пассирования в культурах клеток наблюдалось с 2-го пассажа.

Определение минимальной инфицирующей дозы вируса в культуре клеток. Для определения сроков культивирования штаммов *in vitro* нами была проведена серия экспериментов по изучению динамики репродукции штаммов в культуре клеток ПЯ в зависимости от множественности инфицирующей дозы. Полученные результаты в ходе экспериментов представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Накопление ВОК в зависимости от инфицирующей дозы

Наименование штаммов	Инфицирующая доза, см^3	Срок культивирования, час	Инфекционная активность, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
Вирус осповакцины	0,001	38-45	$5,05 \pm 0,10$
	0,01	32-40	$5,15 \pm 0,10$
	0,1	30-32	$5,00 \pm 0,10$
	1	22-26	$4,45 \pm 0,10$
Вирус оспы коров	0,001	30-32	$5,03 \pm 0,10$
	0,01	24-30	$5,10 \pm 0,10$
	0,1	22-28	$4,75 \pm 0,10$
	1	22-28	$4,40 \pm 0,10$

Было установлено, что максимальное накопление вируса происходит на 2 сутки культивирования: в вирусосодержащей суспензии из штамма ВОК составившей, в среднем $5,10 \pm 0,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, наблюдается при инфицирующей дозе $0,01 \text{ТЦД}_{50}/\text{клетку}$ и при такой же дозе в среднем $5,15 \pm 0,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в вирусосодержащей суспензии из штамма ВОВ. При высокой множественности инфицирования, $0,1 \text{ТЦД}_{50}/\text{клетку}$ и выше, наблюдается более быстрое развитие цитодеструкции, уже на 1-2 сутки культивирования, с низким выходом инфекционного вируса, как правило, не превышающим $4,45 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Таким образом, характер размножения штаммов ВОК в культуре клеток ПЯ, инфицированной различными дозами вируса,

существенно различается и зависит от величины множественности его инфицирующей дозы. Множественность инфицирующей дозы штамма ВОК, при которой выявлены наивысшие показатели его репродукции (инфекционная активность) в полученной вирусосодержащей суспензии является $0,01 \text{ТЦД}_{50}/\text{клетку}$.

Влияние различного температурно-временного режима на репродукцию вируса. Для определения оптимальной температуры выращивания штамма ВОК были испытаны следующие температурные режимы: $33,0 \pm 0,5$, $35 \pm 0,5$ и $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Изучение уровня накопления штаммов ортопоксвирусов при различных температурах инкубирования

Наименование штаммов	Уровень накопления вируса при различных температурах, lg ТЦД ₅₀ /см ³		
	33±1°C	35±1°C	37±1°C
Вирус осповакцины	3,75±0,13	4,75±0,08	4,75±0,11
Вирус оспы коров	3,25±0,00	4,50±0,11	4,66±0,16

Из данных, представленных в таблице 3 видно, что при температуре культивирования (37±1)°C средняя биологическая активность штамма ВОВ составила 4,75 lg ТЦД₅₀/см³, при (35±1)°C 4,75 lg ТЦД₅₀/см³, а при (33±1)°C - 3,75 lg ТЦД₅₀/см³. Температура культивирования штамма ВОК составляла при температуре (37±1)°C - 4,66 lg ТЦД₅₀/см³, при (35±1)°C - 4,50 lg ТЦД₅₀/см³ и при (33±1)°C - 3,25 lg ТЦД₅₀/см³.

По результатам, полученных в ходе проведения данных исследований, было установлено, что для выращивания штамма ВОК в монослое культурах клеток наиболее оптимальной температурой является (37±0,5) °C, так как при данной температуре культивирования получены наивысшие показатели вирусной репродукции (инфекционная активность), который составил, в среднем 4,70±0,11 lg ТЦД₅₀/см³.

Таким образом, результаты данных исследований позволяют сделать вывод о том, что для большего накопления штамма ВОК в культурах клеток ПЯ и VERO при стационарном способе его выращивания, культивирование клеток и вируса необходимо проводить при температуре (37,0±0,5) °C.

Обсуждение

Исторически, противооспенная вакцина нарабатывалась на живых животных. Недостатком такого метода является риск потенциальной контаминации препарата вакцины бактериями, грибами и другими случайными патогенами, что может привести к заражению вакцинируемых опасными заболеваниями. Для уменьшения таких

рисков исследователей начали выращивать штаммы ВОВ на культурах клеток млекопитающих [14]. Поэтому культуры клеток являются наиболее продуктивными и технологичными моделями для культивирования и получения биомассы вирусов в условиях *in vitro*. Для этого необходимо подобрать, в свою очередь, наиболее чувствительную систему для репродукции вируса. Анализируя данные литературы, можно отметить, что наиболее оптимальной для репродукции вируса оспы коров является культивирование его в первично-трипсинизированной культуре клеток почки ягнят. Эта культура широко используется при приготовлении вирус вакцины против многих болезней. [15, 16]. Также следует отметить, что вирус оспы коров размножается в культуре клеток почек и тестикул козлят [17] и в фибробластах куриных эмбрионов. Также клетки почки (RK13) и кожа кролика являются высокочувствительными к вирусу оспы коровы, чем хориоаллантоисную мембрану или в фибробласты куриного эмбриона [18]. В большинстве клеточных линий вирус оспы коров реплицируется медленнее, чем вирус осповакцины, а также образует бляшки меньшего размера, чем натуральной оспы.

В настоящих экспериментах нами были использованы только культуры клеток ПЯ и Vero. В обеих клеточных культурах испытуемые штаммы вирусов хорошо реплицировались, вызывая цитопатологические изменения в виде «гиперпластических очагов» в монослое клетки, в которых соседние клетки могут сливаться с образованием крупных

кариоцитов или может происходить некроз и разрыв клеток с высвобождением ассоциированных с клеткой вирионов. Однако, в литературе имеются данные, что монослой, инфицированные вирусами, образующими «гиперпластические очаги», обычно дают гораздо меньше вируса, чем инфицированные вирусами, образующими «литические бляшки», поскольку большинство клеток в монослое остаются неинфицированными [18]. Однако при серийном пассаже адаптация происходит легко и цитопатические изменения могут превращаться на более «литическую бляшку». Далее в наших экспериментах при пассировании исследуемые штаммы адаптировались в вышеуказанных культурах сокращая время культивирования от 120 ч до 24 ч. В это время, хотя цитопатологическое действие вируса наблюдалось очень быстро (через 6-8 часов после заражения) и полностью повреждало клеточный монослой в течение 24 часов, при этом биологическая активность вируса оставалась неизменной. Однако, несмотря на то, что вирус очень быстро адаптируется к клетке, необходимо определить заражающую дозу вируса с учетом быстрого повреждения клеточного монослоя. Так, при отработке оптимальных параметров культивирования наиболее основным моментом получения высокоактивной вирусной биомассы является установление минимальной инфицирующей дозы вируса, играющая немаловажную роль при его культивировании. Следует отметить, что при определении множественности инфицирующей дозы срок культивирования вируса также остался прежним, тогда как биологическая активность при дозе 0,01 ТЦД была незначительно выше, чем в других испытываемых дозах инфицирования. Однако, при статистической обработке полученных данных при определении минимальной иммунизирующей дозы значимая разница между испытываемых доз вируса не установлена ($p \geq 0,05$). По данным Vabiuk et al. (2007) [19] в клетках Vero плохо реплицируются поксвирусы по сравнению с ПЯ, и, следовательно, было рекомендовано

не использовать их для освежения и выделения вирусов. Однако нами полученные результаты на культуре клеток Vero показали обратное и это факт не установлен.

Многими исследователями [15, 16, 20, 21] доказано, что сбор максимального выхода вирусной массы удается при достижении оптимальных условий для репродукции вируса, где основными факторами являются: множественность инфицирующей дозы, температура инкубирования, поддерживающая среда и т.д. Хотя указанные факторы являются наиболее важными в получении высокоактивного вирусного материала, в данном эксперименте мы не заметили их существенного значения. Это может быть природной особенностью изучаемого вируса, и чтобы дополнить это исследование, необходимо в дальнейшем всесторонне изучить биологические особенности вируса, в частности его иммуногенность.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что штаммы ортопоксвирусов успешно культивируются в культурах клеток ПЯ и VERO с проявлением выраженного цитопатического действия, с биологической активностью $5,15 \pm 0,11 - 5,10 \pm 0,11$ lg ТЦД₅₀/см³, соответственно.

Репродукция вируса в культурах клеток остается стабильной и при проведении 20-ти последовательных пассажей.

Также установлены оптимальные параметры культивирования в культуре клеток ПЯ, где инфицирующая доза составляет 0,01 ТЦД₅₀/клетку для штамма ВОВ, со сроком инкубирования 32-40 час, при температуре культивирования $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и для штамма ВОК 0,01 ТЦД₅₀/клетку со сроком инкубирования 24-30 час, при температуре культивирования $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Одним из важнейших моментов данного исследования является то, что изучение культуральных свойств исследуемого вируса относится к классической вирусологии и носит эмпирический характер, но имеет

большое значение в получении вирусной биомассы, пригодного для изготовления безопасных и эффективных противооспепных вакцин.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории «Технологии готовых форм биопрепаратов» и «Коллекции микро-организмов» за оказанную помощь при выполнении научно-исследовательской работы по теме статьи.

Литература

1. Сидорчук, А.А. История создания вакцин и вакцинации. Часть II. Оспа и сибирская язва / А.А. Сидорчук // Российский ветеринарный журнал. — 2018. — № 6. — С. 12–14. DOI: 10.32416/article_5c050ab91c6a36.36611669.
2. Singh, R.K.; Balamurugan, V.; Bhanuprakash, V.; Venkatesan, G.; Hosamani, M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: Global scenario and perspectives. *Indian J. Virol.* 2012, 23, 1–11.
3. Franco-Luiz, A.P.M.; Fagundes-Pereira, A.; Costa, G.B.; Alves, P.A.; Oliveira, D.B.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Panei, C.J.; Galosi, C.M. Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, 20, 1576.
4. Franco-Luiz, A.P.M.; Oliveira, D.B.; Pereira, A.F.; Gasparini, M.C.S.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P.; de Souza Trindade, G.; Puentes, R.; Furtado, A.; Abrahão, J.S. Detection of vaccinia virus in dairy cattle serum samples from 2009, Uruguay. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, 22, 2174.
5. Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierroutsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21:153–6.
6. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:777–80.
7. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:781–4.
8. Cohen J. Bioterrorism. Smallpox vaccinations: how much protection remains? *Science.* 2001; 294:985.
9. Ершебулов З.Д., Абдураимов Е.О., Шаршеналиева Г.А. Определение параметров культивирования штамма «Казахстанский» вируса оспы коз. *Известия вузов, № 5, 2014.* –с.128-131
10. Reed, L.J. & Muench, H. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *American Journal of Epidemiology* 27, 493–497, [https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408\(1938\)](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408(1938)).
11. Ramyar H., Hessami M., Ghaboussi B. La variole caprine: valeur immunogene du virus vaccine modifie sur cultures cellulaires // *Rec. med. vet.* 1974. 150. 2. – P.131-133.
12. Кореба О.А. Биологические свойства штаммов вируса оспы овец // Дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. п.г.т. Гвардейский 1984.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НТП на тему «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» по целевому финансированию на 2021–2023 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

13. Черно́с В.И., Васи́льева Н.Н., Анто́нова Т.П. и др. получение аттенуированных штаммов вируса осповакцины и изучение их свойств // В сб.: Междунар. симпозиум по стандартизации мед. и биол. препаратов. М. 1976. –С.98-99.
14. Щелкунова Г.А., Щелкунов С.Н. 40 лет без оспы. Acta Naturae/ т.9. №4 (35) 2017. –с.4-12
15. Ramyar H. Propagation of goat pox virus on monolayer cell cultures // Arch. Inst. Rasi. 1968. 20. – P.91-95.
16. Абдураимов Е.О., Мамбеталиев М.А., Мамадалиев С.М. Изучение чувствительности различных культур клеток к вирусу оспы коз // Биотехнология. Теория и практика. №3-4. 2000. –С.50.
17. Nitsche A., Kurth A., Pauli G. Viremia in human Cowpox virus infection. J. Clin. Virol. 2007.
18. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication.
19. S. Babiuk, T. R. Bowden, D. B. Boyle, D. B. Wallace, R. P. Kitching Capripoxviruses: An Emerging Worldwide Threat to Sheep, Goats and Cattle // Transboundary and Emerging Diseases- Volume 55, Issue 7 p. 263-272.
20. Сейткасымов Б.К., Курченко Ф.П., Алехина С.Г., Симановская О.С. Изучение влияния различных факторов на накопление штамма Кореба О. А. Биологические свойства штаммов вируса оспы овец // Дисс. канд. биол. наук. - п.г.т. Гвардейский. - 1984.
21. Кореба О. А. Биологические свойства штаммов вируса оспы овец // Дисс. канд. биол. наук. - п.г.т. Гвардейский. - 1984.