

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Выделение нового штамма М-2020 вируса оспы верблюдов (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelopox virus*) в Республике Казахстан и изучение его репродукции на различных биологических системах

Жугунисов К.Д.¹, Мамбеталиев М.А.¹, Азанбекова М.А.¹, Кенжебаева М.К.¹, Килибаев С.С.¹, Туысканова М.С.^{1,2}, Джапашева А.С.¹, Омуртай А.Д.¹, Табыс Ш.Т.¹

¹ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (НИИПББ КН МОН РК), 080409, Жамбылская область, Кордайский р-н, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан;

²НАО «Казахский национальный университет имени Аль-Фараби», 050040, Алматы, Республика Казахстан

Введение. В данной работе представлены результаты выделения вируса оспы верблюдов (ОВ) (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelopox virus*, CMLPV) и изучения его репродуктивных свойств на чувствительных биологических системах.

Материал и методы. В исследовании использован эпизоотический штамм М-96 вируса, а также его аттенуированные варианты КМ-40 и КМ-70, полученные путём последовательного пассирования. Выделение возбудителя из суспензии биопсийных образцов осуществляли на культуре клеток и в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Все эксперименты проводили с числом повторности, обеспечивающим получение достоверных результатов.

Результаты. В серии экспериментов выделен вирус ОВ из корочек и соскобов с оспенными папулами кожи, полученных во время вспышки заболевания от больных верблюдов (*Camelus bactrianus*) из различных районов Мангистауской области Республики Казахстан в конце 2019 г. При этом признаки размножения возбудителя на хорион-аллантоиной оболочке (ХАО) отмечались с 3 пассажира. Полученный вирус вызывал формирование на ХАО патологических изменений в виде возвышающихся точечных или сплошных узелков белого цвета, ограниченных от окружающей ткани, с геморрагическими очагами в центре, в размере от 1,0 до 5,0 мм. Определены репродуктивные свойства изолята на чувствительных биологических системах в сравнении с эпизоотическим штаммом М-96 CMLPV, выделенным ранее на территории Казахстана во время вспышки ОВ 1996 г., а также его аттенуированными вариантами. Выделенному вирусу присвоено условное название М-2020.

Обсуждение. При исследовании в обеих чувствительных системах культивирования (клеточной культуре и РКЭ) штаммы М-96 и его аттенуированные варианты КМ-40, КМ-70, использованные в экспериментах в качестве контроля, продемонстрировали высокую инфекционную активность с титром 4,75–6,75 lg ТЦД₅₀/см³, тогда как для исследуемого изолята вируса ОВ М-2020 указанная величина оказалась существенно ниже (3,00–4,75 lg ТЦД₅₀/см³, $p > 0,05$).

Ключевые слова: оспа верблюдов; вирус; выделение; куриные эмбрионы; культура клеток

Для цитирования: Жугунисов К.Д., Мамбеталиев М.А., Азанбекова М.А., Кенжебаева М.К., Килибаев С.С., Туысканова М.С., Джапашева А.С., Омуртай А.Д., Табыс Ш.Т. Выделение нового штамма М-2020 вируса оспы верблюдов (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelopox virus*) в Республике Казахстан и изучение его репродукции на различных биологических системах. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 77-86.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

Для корреспонденции: Туысканова Молдир Сержанкызы, магистр биологии, младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов» ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский р-н, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: monica_94@list.ru

Участие авторов: Жугунисов К.Д. – планирование исследования, статистическая обработка результатов, оформление статьи; Мамбеталиев М.А. – проведение мониторинговых исследований, отбор биопроб; Азанбекова М.А. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Кенжебаева М.К. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Килибаев С.С. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Омуртай А.А. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Табыс Ш.Т. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Туысканова М.С. – оформление статьи, связь с редакцией.

Финансирование. Работа выполнена в рамках научного проекта на тему «Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против оспы верблюдов» (AP09258770) по грантовому финансированию на 2021–2023 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.01.2022
Принята в печать 02.02.2022
Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus*) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems

Kuandyk D. Zhugunissov¹, Muratbay A. Mambetaliyev¹, Moldyr A. Azanbekova¹, Marzhan K. Kenzhebaeva¹, Sanat S. Kilibayev¹, Moldir S. Tuyskanova^{1,2}, Arailym S. Dzhaspasheva¹, Alisher D. Omurtay¹, Shalkar T. Tabys¹

¹DGE «Research Institute for Biological Safety Problems», Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan;

²NJSC «Al-Farabi Kazakh National University», 050040, Almaty, Republic of Kazakhstan

Introduction. This article presents the results of isolation of camel smallpox virus (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus*, CMLPV) and study of its reproductive properties on sensitive biological systems.

Material and methods. The epizootic strain M-96 of the virus as well as its attenuated variants KM-40 and KM-70 obtained by sequential passivation were used in the study. Isolation of the pathogen from suspension of biopsy specimens was performed on cell culture and in embryonated chicken eggs (ECEs). All experiments were performed with the number of replications ensuring obtaining reliable results.

Results. The CMLPV was isolated from the crusts and pox papules of the skin taken from sick camels (*Camelus bactrianus*) during an outbreak in various districts of the Mangistau region at the end of 2019. The signs of pathogen reproduction on chorio-allantoic membrane (CAM) were observed from 3 passages. The obtained virus caused formation of pathological changes on the CAM in the form of elevated dot or solid white formations separated from the surrounding tissue, with hemorrhagic foci in the center. The reproductive properties of the isolate on sensitive biological systems were determined in comparison with the epizootic CMLPV strain M-96, isolated earlier in the territory of Kazakhstan during the outbreak 23–24 years ago, as well as its attenuated variants. The isolated virus was given the conventional name M-2020.

Discussion. When studied in two sensitive cultivation systems (cell culture and ECEs), strain M-96 and its attenuated variants KM-40, KM-70, which were used in the experiments as a control, demonstrated high infectious activity with titer 4.75–6.75 lg TCID₅₀/cm³, while for the examined isolate M-2020 of CMLPV had the significantly lower values (3.00–4.75 lg TCID₅₀/cm³, $p > 0,05$).

Key words: camelpox; virus; isolation; embryonated chicken eggs; cell culture

For citation: Zhugunissov K.D., Mambetaliyev M.A., Azanbekova M.A., Kenzhebaeva M.K., Kilibayev S.S., Tuyskanova M.S., Dzhaspasheva A.S., Omurtay A.D., Tabys Sh.T. Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus*) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 77–86. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

For correspondence: Moldir S. Tuyskanova, M.Biol., Junior Researcher, Laboratory «Collection of Microorganisms», DGE «Research Institute for Biological Safety Problems», Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, (RIBSP), 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan. E-mail: monica_94@list.ru

Information about the authors:

Zhugunissov K.D., <https://orcid.org/0000-0003-4238-5116>

Mambetaliyev M.A., <https://orcid.org/0000-0001-6034-6642>

Azanbekova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-5807-7604>

Kenzhebaeva M.K., <https://orcid.org/0000-0001-6666-6532>

Kilibayev S.S., <https://orcid.org/0000-0001-9203-2189>

Tuyskanova M.S., <https://orcid.org/0000-0001-6565-082X>

Dzhapasheva A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7414-4635>

Omurtay A.D., <https://orcid.org/0000-0002-9331-5161>

Tabys Sh.T., <https://orcid.org/0000-0002-4909-6598>

Contribution: Zhugunissov K.D. – research planning, statistical processing of results, registration of articles; Mambetaliev M.A. – monitoring studies, selection of biological samples; Azanbekova A.A. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of the isolate; Kenzhebaeva M.K. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Kilibayev S.S. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Dzhapasheva A.S. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Omurtay A.A. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Tabys Sh.T. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Tuyskanova M.S. – preparation of the article, communication with the editors.

Funding. The work was carried out within the scientific project on «Development of technology for manufacturing inactivated vaccine against camel smallpox» (AP09258770) under grant funding for 2021–2023 supported by the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Received 12 January 2022

Accepted 02 February 2022

Published 28 February 2022

Введение

Одной из отраслей животноводства пустынных и полупустынных зон Республики Казахстан является верблюдоводство, занимающее определённое место в сельскохозяйственном производстве с обеспечением потребностей населения в мясе, молоке и шерсти. Во многом благодаря этому становится возможным освоение таких природных зон [1]. В настоящее время ставится задача превратить верблюдоводство в высокодоходную отрасль продуктивного животноводства. Для этого необходимо увеличить и сохранить поголовье верблюдов (*Camelus bactrianus*), принять возможные меры по защите его от инфекционных болезней, в т.ч. оспы верблюдов (ОВ), периодически наносящей значительный экономический ущерб [2]. На территории Казахстана ОВ периодически наблюдалась в Мангистауской и Атырауской (Гурьевской) областях на протяжении 1930 г., 1942–1943, 1965–1967, 1968–1969 гг. [3] и 1996 г. Во время вспышки в 1996 г. в Мангистауской области из 8 тыс. особей заболели 830, из них 43 пали [4]. В этот период сотрудниками ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (НИИПББ КН МОН РК) на территории региона выделен эпизоотический штамм М-96 вируса ОВ (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camel痘 virus, CMLPV*), изучены его биологические, морфологические, физико-химические и генетические свойства [5–9]. Позже полный геном штамма был секвенирован и депонирован в базе GenBank (№ AF438165.1) [10]. После указанной вспышки ОВ вновь регистрировалась в Мангистауской области летом 2019 г.; диагноз подтверждён лабораторно сотрудниками НИИПББ в декабре того же года (неопубликованные данные). В конце 2019 г. в это учреждение доставлен патологический биоматериал от заболевших особей из различных районов Мангистауской области с целью выделения вируса и последующего изучения его репродуктивных свойств на различных биологи-

ческих системах в сравнении с другими штаммами, имеющимися в коллекции микроорганизмов НИИПББ. Важно отметить, что проведение такого рода исследований позволяет правильно организовать профилактические мероприятия, а также наладить производство диагностических и вакцинных препаратов против особо опасных инфекций животных.

С учётом изложенного целью данной работы стало выделение и изучение репродуктивных свойств изолята вируса ОВ, полученного при вспышках болезни на территории Мангистауской области в 2019 г.

Материал и методы

Вирус и патологический материал. В работе использован эпизоотический штамм М-96 вируса ОВ, который выделен от верблюда, заболевшего в период вспышки в Мангистауской области в 1996 г., а также его аттенуированные варианты КМ-40 и КМ-70, полученные путём последовательного пассирования на чувствительных биологических системах. Объектом исследования был патологический биологический материал (корочки и соскобы с оспенными папулами кожи), отобранный от больных животных во время вспышки ОВ из различных районов Мангистауской области в конце 2019 г. Расположение региона и места отбора биопроб представлены на **рис. 1**.

Биологические системы культивирования. При проведении экспериментов использовали первично-трипсинизированную культуру клеток почки ягнёнка (ПЯ), выращенной в питательной среде с 10% содержанием фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) (fetal bovine serum, FBS), а также развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) в возрасте 11–12 сут. Последние получены с птицефабрик с благополучной ситуацией по эпидемиологическому статусу и показателям биологической безопасности.

Выделение и культивирование вируса на чувствительных биологических системах. Выделение возбудителя из суспензии биопсийных образцов проводили на клеточной культуре и в РКЭ, как описано

в протоколах Всемирной организации здравоохранения животных (Office International des Epizooties (OIE), 2019) [11]. Перед инфицированием эмбрионы подвергали органолептическому контролю посредством овоскопирования. После соответствующей обработки скорлупы эмбриона над областью воздушной камеры (пуги) тонко отточенным металлическим копьём осуществляли прокол и с помощью пинцета формировали отверстие размером 4–5 мм в диаметре. Затем на подскорлуповой оболочке стерильными иглами в 2–3 местах делали насечки и наносили в них вирусный материал в объёме 0,2 см³. Отверстие в скорлупе заклеивали лейкопластырем, после чего РКЭ инкубировали в вертикальном положении при температуре (37 ± 0,5) °С и относительной влажности воздуха (55 ± 5) % в течение 120 ч.

С целью контроля оставляли незаражёнными 2–3 эмбриона, которым на хорион-аллантаисную оболочку (ХАО) наносили физиологический (0,9%) раствор хлорида натрия в том же объёме. Овоскопический контроль осуществляли ежедневно. Гибель эмбрионов в течение первых 48 ч расценивали как неспецифичную. Начиная с 3-суточного срока инкубирования погибшие РКЭ помещали в бытовой холодильник при (4 ± 2) °С и сохраняли до окончания опыта. Эмбрионы, оставшиеся живыми на протяжении 120 ч, после инкубирования также охлаждали в бытовом холодильнике при аналогичном температурном режиме не менее 18 ч.

Титр вируса ВО в полученных образцах определяли титрованием в первичной культуре клеток ПЯ или РКЭ согласно описанной ранее методике [9].

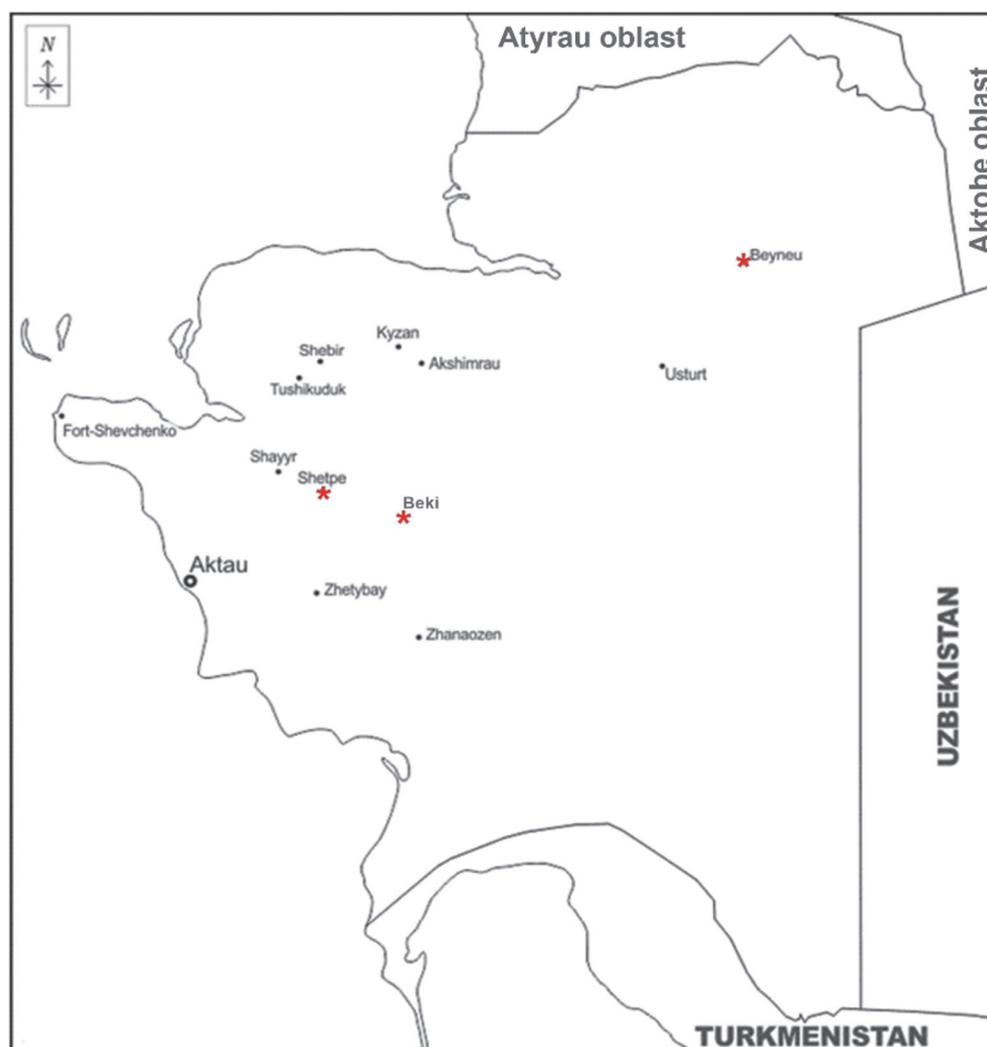


Рис. 1. Карта Мангистауской области и места отбора патологического биоматериала на территории.

Место отбора проб обозначены красными звездочками.

Fig. 1. Map and locations for sampling of the pathological material in Mangistau region.

Sampling location is indicated with red asterisks.

Показателем титра считали наибольшее его разведение, вызывающее цитопатическое действие (ЦПД) в 50% заражённых проб с клеточной культурой или образованием оспенных бляшек на ХАО РКЭ. Непосредственное значение вычисляли по методу Рида и Менча [12] с выражением в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (ТЦД – тканевая цитопатическая доза) для культуры клеток ПЯ или в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ (ЭИД – эмбриональная инфицирующая доза) в случае РКЭ.

Электронно-микроскопические исследования. Пробы готовили методом негативного контрастирования с использованием 2 % водного раствора фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК). Каплю материала, содержащего вирус, помещали в лунку тefлоновой пластины. На каплю наносили опорную сетку с пленкой-подложкой, напыленной углем. Через 5–10 мин адсорбции сетку удаляли, а избыток жидкости отбирали фильтровальной бумагой. Сетку с образцом переносили на 1–2 мин на 1 каплю раствора ФВК pH 6,8, а затем на 5 мин – на 1 раствора ФВК pH 7,0. После контрастирования и удаления избытка контрастера препарат подсушивали на воздухе. Препараты исследовали на электронном микроскопе «JEM-100 CX JEOL» (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении $\times 20\,000$ – $150\,000$.

Определение антигенного родства вируса. Антигенное родство между новым изолятом и ранее выделенным штаммом устанавливали в процессе реакции нейтрализации с использованием специфической

сыворотки, полученной от верблюдов, иммунизированных аттенуированным штаммом KM-40 CMLPV. Учёт результатов нейтрализации проводили на протяжении 7 сут по наличию или отсутствию ЦПД вируса в культуре клеток ПЯ.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполняли с числом повторностей, обеспечивающим получение достоверных результатов. Статистическую обработку проводили с вычислением среднего арифметического значения (X) и средней квадратической ошибки (m) при помощи программы GraphPad Prism v.9. Различия считали статистически значимыми при уровне достоверности 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты

Выделение вируса оспы верблюдов в развивающихся куриных эмбрионах. Результаты экспериментов, проведённых *in vitro* с использованием чувствительных биологических систем, приведены в **табл. 1**.

Как видно из данных **табл. 1**, после вскрытия РКЭ при исследовании ХАО оспенные узелки в 1 и 2 пассажах не обнаружены. В образце № 5 признаки размножения вируса отмечались с 3 пассажа. До этого момента поражения были слабо выражены и характеризовались наличием в месте инокуляции единичных ограниченных узелков, возвышающихся над окружающей поверхностью. Видимые патологические изменения на ХАО наблюдались с 6 пассажа; при этом в указанной области регистрировались обширные

Таблица 1. Результаты биопроб по выделению вируса оспы верблюдов на развивающихся куриных эмбрионах методом последовательного пассажа

Table 1. Results of bioassays for the isolation of camelpox virus on the embryonated chicken eggs by the method of serial passages

Номер биопробы Bioassay number	Наименование изолята и дата получения образца Name of the isolate and sampling date of the pathological material	Количество пассажей и результаты пассирования Number of passages and passing results					
		I	II	III	IV	V	VI
1	№ 1 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 1 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
2	№ 2 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 2 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
3	№ 3, 1272 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 3 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
4	№ 4, 303405 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 4 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
5	№ KZR506384619, от 12.12.2019 г., из корочки, район Бейнеу No. KZR506384619, dated December 12, 2019, from the crust, Beyneu district	–	–	+	+	+	+
6	№ KZR506384620, от 12.12.2019 г., из корочки, район Бейнеу No. KZR506384620, dated December 12, 2019, from the crust, Beyneu district	–	–	–	–	–	–
7	№ KZR506375943, от 12.12.2019 г., из корочки, район Бейнеу No. KZR506375943, dated December 12, 2019, from the crust, Beyneu district	–	–	–	–	–	–
8	№ 06290618, от 12.12.2019 г., из корочки, район Беки No. 06290618, dated December 12, 2019, from the crust, Beki district	–	–	–	–	–	–
9	№ 06302984 от 12.12.2019 г., из корочки, район Беки No. 06302984, dated December 12, 2019, from the crust, Beki district	–	–	–	–	–	–
10	№ 06302710 от 12.12.2019 г., из корочки, район Беки No. 06302710, dated December 12, 2019, from the crust, Beki district	–	–	–	–	–	–

Примечание. «–» – отсутствие оспенных бляшек на хорион-аллантаической оболочке; «+» – наличие оспенных бляшек на хорион-аллантаической оболочке.

Note. «–», no camelpox plaques on the chorio-allantoic membrane; «+», presence of camelpox plaques on the chorio-allantoic membrane.

участки поражения, представляющие собой выступающие над поверхностью оболочки сплошные белые образования с очагами кровоизлияния. Следует отметить, что из других образцов вирус не выделен, так как оспенные узелки отсутствовали даже при последовательном пассировании до уровня 6 пассажа.

Таким образом, в результате проведённых исследований из доставленного биоматериала изолирован вариант вируса ОВ, который получил предварительное название М-2020. После тщательного изучения биологических и генетических свойств изолята предполагаются его паспортизация и депонирование в соответствующие базы данных для пополнения ряда коллекционных штаммов в качестве вирулентного образца, предназначенного для контроля иммуногенности вакцин, а также выполнения научно-исследовательских работ.

Изучение репродуктивных свойств изолята М-2020 на биологических системах. Для сравнительного изучения репродуктивных свойств изолята М-2020 с другими штаммами СМЛРВ использованы эпизоотический штамм М-96 и его аттенуированные варианты КМ-40 и КМ-70. Эксперименты выполнены на РКЭ.

Специфичность вирусосодержащих материалов оценивали по наличию характерного ЦПД в монослое культуры клеток (рис. 2) или по выявлению бляшек на ХАО куриных эмбрионов (рис. 3), а также в соответствии с результатами электронно-микроскопических исследований (рис. 4).

Из рис. 1 видно, что ЦПД вируса в культуре клеток ПЯ характеризовалось очаговым поражением монослоя в виде наличия имеющих светопреломляющую цитоплазму клеточных элементов различной формы (округлые, веретенообразные, овальные) с чёткими очертаниями ядерной и цитоплазматической оболочки. При этом отмечалась отёчность этих клеток с увеличением их в размерах в несколько раз по сравнению с нормальными. На местах отмерших клеток

образовывались пустые участки. При заражении куриных эмбрионов появление оспенных бляшек на ХАО регистрировалось спустя 48–72 ч с максимальным развитием изменений на 72–96 ч. Через 96–120 ч помимо бляшек имели место вторичные поражения в виде ограниченных беловатых узелков размерами от 1,0 до 2,0–3,0 мм, рассеянных по всей поверхности оболочки по ходу кровеносных сосудов (рис. 3 а, б).

Результаты экспериментов по изучению репродуктивных свойств изолята М-2020 в сравнении с другими штаммами вируса ОВ на чувствительных биологических системах представлены в табл. 2.

Приведённые данные свидетельствуют о стабильной высокой биологической активности всех штаммов ВОВ в культуре клеток ПЯ и РКЭ с показателями титра от $3,00 \pm 0,08$ до $6,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на 4–5 сут культивирования. Эти результаты позволяют заключить, что все испытываемые штаммы хорошо культивируются в чувствительных системах (независимо от адаптации к той или иной из них) с высокой инфекционной активностью.

Изучение антигенного родства изолята М-2020 вируса оспы верблюдов. Установление антигенной идентичности нового изолята вируса ОВ проведено в реакции нейтрализации с использованием специфической и нормальной сывороток животных. Результаты исследования представлены в табл. 3.

При изучении антигенной взаимосвязи между изолятом и аттенуированным штаммом вируса ОВ установлено, что в реакции нейтрализации, протекавшей в клеточной культуре, полученная от вакцинированных животных специфическая сыворотка в разведении 1 : 32 полностью нейтрализовала полевой изолят вирулентного возбудителя в дозе $200 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Обсуждение

Выделение возбудителя как основной исследовательский метод классической вирусологии имеет осо-

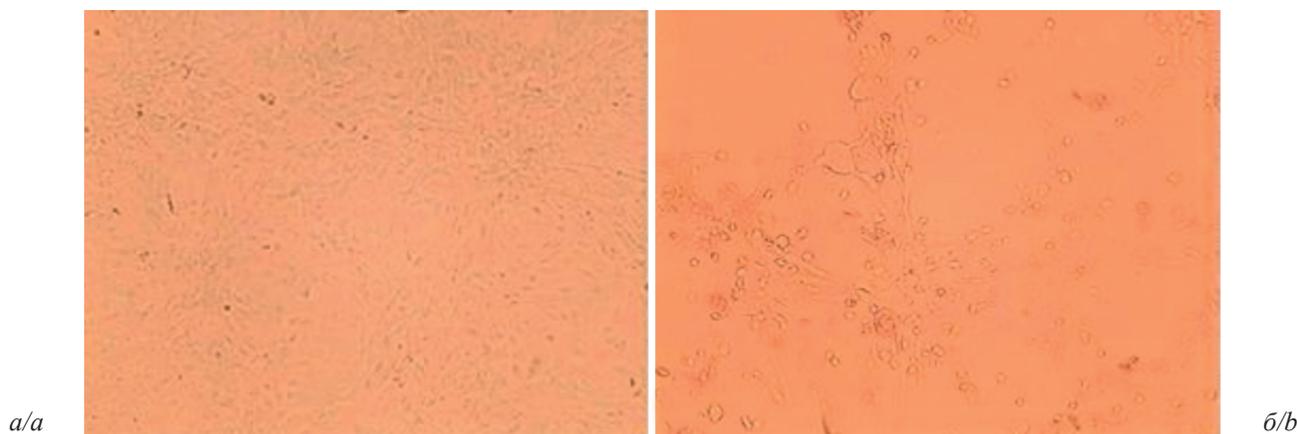


Рис. 2. Световая микроскопия культуры клеток почки ягнёнка до и после заражения вирусом оспы верблюдов: а) – неинфицированная клеточная культура (контроль на 3 сут); б) – цитопатическое действие вируса в культуре (на 3 сут после инфицирования). Микрофотография (увеличение $\times 20$).

Fig.2. Light microscopy of the lamb kidney cells before and after infection with CMLPV: а) , non-infected lamb kidney cells (control on the 3rd day); б) , cytopathic effect of the virus in the cell culture (on the 3rd day after infection). Microphotograph (magnification $\times 20$).



Рис. 3. Характерные бляшки на хорион-аллантаической оболочке куриных эмбрионов при инфицировании штаммами вируса оспы верблюдов; *a)* – при заражении штаммом KM-40; *б)* – при заражении изолятом M-2020. Нативный макропрепарат.

Fig. 3. Characteristic plaques on the chorioallantoic membrane of chicken embryos when infected with strains of the CMLPV: *a)*, after infection with strain KM-40; *b)*, after infection with isolate M-2020. Native macropreparation.

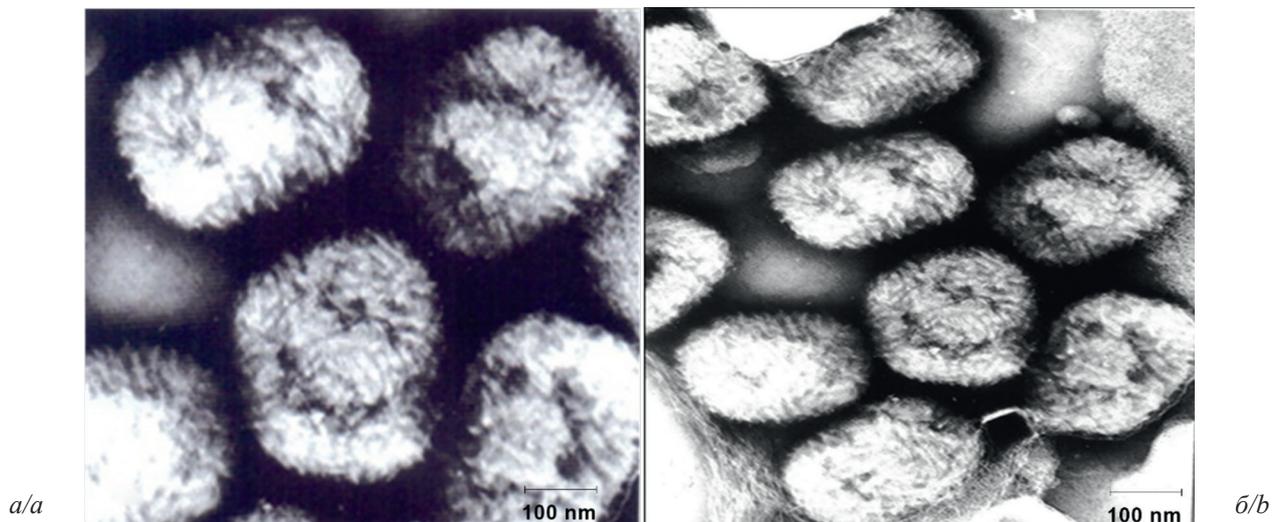


Рис. 4. Электронная микроскопия вирионов оспы верблюдов: *a)* – штамм M-96, *б)* – изолят M-2020. Микрофотография, негативное контрастирование 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты, увеличение $\times 150\,000$ (по Н.С. Кожаберганову).

Fig. 4. Electron microscopy of the camelpox virions: *a)*, strain M-96; *b)*, isolate M-2020. Microphotograph, negative staining with 2% phosphotungstic acid solution, magnification $\times 150\,000$ (according to Kozhabergenov N.S.).

бое значение в экспериментальной работе. Так, чистая культура изолированного вируса представляет научный интерес при исследовании его филогенеза и эволюции путём изучения биологических, молекулярно-генетических свойств и в перспективе является биологическим резервом, который может быть широко использован при разработке средств диагностики и профилактики заболевания. Для выделения чистой культуры применяются чувствительные биологические системы (лабораторные модели животных, клеточные культуры и куриные эмбрионы) в зависимости от тропизма исследуемого инфекционного агента. По данным ли-

тературных источников, РКЭ возраста 11–12 сут являются одной из оптимальных систем для первичного выделения вируса ОВ из патологических материалов [11–13]. В соответствии с этим первичное выделение инфекционного агента проведено нами на куриных эмбрионах путём заражения через ХАО. Установлено, что признаки размножения вируса на отмечались с 3 пассажа. Изолят M-2020 вызывал формирование на ХАО патологических изменений в виде возвышающихся точечных или сплошных поражений в виде узелков белого цвета, отграниченных от окружающей ткани, с геморрагическими очагами в центре. Анало-

гичная в визуальном отношении картина наблюдалась также в работах других авторов [3, 5, 14].

В литературе имеются данные об успешном культивировании CMLPV в организме естественно восприимчивых животных [3], в первичных и перевиваемых культурах клеток почки ягненка (ПЯ), почки телёнка (ПТ-80), кожи плода верблюда (КПВ), фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК), почки африканской зелёной мартышки (Vero), почки новорождённого сирийского хомячка (ВНК-21), клетки опухоли шейки матки

(HeLa) [5, 14–17], а также о невосприимчивости к данному патогену всех видов лабораторных животных моделей, включая птиц (*Aves*) [3, 19]. С учётом этих сведений нами изучены репродуктивные свойства казахстанского изолята М-2020 на культуре ПЯ и РКЭ в сравнении с эпизоотическим штаммом М-96 ВОВ, который ранее выделен на территории Казахстана во время вспышки ОВ 1996 г., а также его аттенуированными вариантами. Следует отметить, что эпизоотический штамм М-96 и его репродуктивные свойства

Таблица 2. Показатели биологической активности культуральных и эмбриональных вирусосодержащих суспензий штаммов вируса оспы верблюдов

Table 2. Indicators of the biological activity of cultured and embryonic virus-containing suspensions of CMLPV strains

Наименование штамма Strain name	Уровень пассажа Passage level	Начало проявления ЦПД на бляшках, сут Onset of the CPE manifestation on plaques, day	Срок культивирования, сут Cultivating period, days	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ ($X \pm m$) Virus titer, lg TCID ₅₀ /cm ³ ($X \pm m$)	Титр вируса, lg ЭИД ₅₀ /см ³ ($X \pm m$) Virus titer, lg EID ₅₀ /cm ³ ($X \pm m$)
KM-40	I	3	5	5,75 ± 0,14	5,83 ± 0,08
	II	3	5	5,83 ± 0,08	6,00 ± 0,14
	III	3	5	6,00 ± 0,25	6,75 ± 0,14
	IV	3	5	6,75 ± 0,25	6,50 ± 0,25
	V	3	4	6,50 ± 0,25	6,75 ± 0,08
KM-70	I	3	5	5,75 ± 0,14	н.и. n.i.
	II	3	5	5,83 ± 0,08	н.и. n.i.
	III	3	5	6,00 ± 0,14	н.и. n.i.
	IV	3	5	6,75 ± 0,14	н.и. n.i.
	V	3	5	6,50 ± 0,08	н.и. n.i.
M-96	I	3	7	4,75 ± 0,08	5,00 ± 0,12
	II	3	7	4,81 ± 0,14	5,20 ± 0,17
	III	3	7	5,25 ± 0,13	5,50 ± 0,08
	IV	3	6	5,50 ± 0,08	5,75 ± 0,10
	V	3	5	5,50 ± 0,08	6,00 ± 0,08
M-2020	I	3	7	3,00 ± 0,11	3,50 ± 0,12
	II	3	7	3,00 ± 0,08	3,78 ± 0,11
	III	3	7	3,25 ± 0,12	4,00 ± 0,08
	IV	3	6	4,25 ± 0,08	4,50 ± 0,11
	V	3	6	4,50 ± 0,08	4,75 ± 0,08

Примечание. н.и. – не исследовано; ТЦД – тканевая цитопатическая доза; ЭИД – эмбриональная инфицирующая доза.

Note. n.i, not investigated; TCID, tissue culture infectious dose; EID, embryo infectious dose.

Таблица 3. Результаты определения антигенной идентичности выделенного вируса оспы верблюдов со специфической сывороткой в реакции нейтрализации

Table 3. Results of the assesment of the antigenic identity of isolated CMLPV with specific serum in the neutralization test

Сыворотка Serum	Разведение специфической и нормальной сыворотки Dilution of specific and normal sera						Титр антител в реакции нейтрализации Antibody titer in the neutralization test
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	
Специфическая Specific	----	----	----	----	----	++++	1 : 32
Нормальная Normal	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0

Примечание. «-» – отсутствие цитопатического действия; «+» – наличие цитопатического действия.

Note. «-», no cytopathic effect; «+», presence of cytopathic effect.

подробно изучены Е.А. Булатовым и соавт. [5]. Ими показано, что из 19 испытанных видов клеточных культур и куриных эмбрионов наиболее чувствительными к этому штамму являются первично-трипсинизированные культуры клеток ПЯ и эмбриональной почки ягненка (ЭПЯ), перевиваемые линии Vero, почка овцы (ПО), а также РКЭ. При этом вирус репродуцировался в культурах ПЯ и ЭПЯ в титрах 4,00–5,75 и 4,75–4,86 соответственно; в перевиваемых линиях культур Vero – 4,00–5,50, ПО – 3,75–5,25 lg ТЦД₅₀/см³ и на КЭ в титрах от 4,70 до 6,00 lg ЭИД₅₀/см³. В то время как в клеточных культурах почки камерунских коз (ПКК), почки собаки (МДСК), свиной почки эмбриональной версензированной (СПЭВ) и поджелудочной железы кролика (ПЖК) ЦПД вируса обнаруживалось только в первом (титры 0,5–3,50 lg ТЦД₅₀/см³) пассаже, в культурах лёгкие эмбриона овцы (ЛЭО), кожи эмбриона овцы (КЭО), тестикул ягненка (ТЯ) аналогичный эффект отмечался в первых 2 пассажах (титры 0,25–5,50 lg ТЦД₅₀/см³), то в экспериментах с использованием ПЖК, ПТ-80, тестикул теленка (ТТ) и почки молодого бычка (МДВК) проявление ЦПД вируса не зарегистрировано. Штаммы (М-96 и его аттенуированные варианты КМ-40, КМ-70), использованные нами в экспериментах в качестве контроля, показали высокую инфекционную активность с титром 4,75–6,75 lg ТЦД₅₀/см³, тогда как на обеих системах культивирования это значение для исследуемого изолята М-2020 оказалось существенно более низким (3,00–4,75 lg ТЦД₅₀/см³, $p > 0,05$) по сравнению с другими штаммами. Низкая биологическая активность выделенного варианта вируса может быть связана с такими факторами культивирования, как величина минимальной инфицирующей дозы (МИД), температура инкубирования, способ культивирования, характер питательной среды и т.д. [20].

Заключение

В результате проведённых исследований выделен возбудитель, который идентифицирован как вирус ОВ методом реакции нейтрализации и посредством электронной микроскопии. Данный изолят будет использован в дальнейших исследованиях при разработке вакцинных препаратов с возможностью определения их протективности при контрольном заражении восприимчивых животных. На первом этапе определены репродуктивные свойства выделенного варианта вируса. В настоящее время продолжается изучение его генетических свойств с последующими вакцинацией и депонированием в репозитории возбудителей особо опасных болезней республиканской коллекции микроорганизмов в качестве штамма М-2020 CMLPV.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сатбеков Е.С. Получение и испытание на специфическую активность гипериммунной сыворотки против оспы верблюдов. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1971; (2): 101–4.
2. Трабаев О. Результаты изучения устойчивости вируса оспы верблюдов в различных условиях внешней среды и при воздействии антибиотиков и дезсредств. В кн.: *Труды Алма-Атинского ЗВИ. Том XX: Инфекционные и паразитарные заболевания сельскохозяйственных животных*. Алма-Ата; 1972: 34–5.

3. Садыков Р.Г. Культивирование вируса оспы верблюдов на куриных эмбрионах. *Вирусные болезни сельскохозяйственных животных*. 1970; (1): 1–25.
4. Булатов Е.А., Мамадалиев С.М., Мамбеталиев М. Изучение основных биофизических характеристик вируса оспы верблюдов из штамма «М-96». *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфулина*. 2009; (4): 225–9.
5. Булатов Е.А., Мамадалиев С.М., Мамбеталиев М., Битов Н.Т. О циркуляции вируса оспы верблюдов в Мангистауской области Республики Казахстан в скрытой форме. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2010; (3): 10–3.
6. Султанкулова К.Т., Зайцев В.Л. *Вирус оспы верблюдов: биологические свойства, структура генома и диагностика. Морфология и структура вируса*. Алматы; 2017: 37–40.
7. Сюрин В.Н. *Руководство по ветеринарной вирусологии*. Москва: Колос; 1966.
8. Сергеев В.А. *Размножение вируса животных в клетках ткани*. Москва: Колос; 1966.
9. Marennikova S.S., Shenkman L.S., Shelukhina E.M., Maltseva N.N. Isolation of camel pox virus and investigation of its properties. *Acta virologica*. 1974; 18(5): 423–8.
10. Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., Kerembekova Z.U., et al. The genome of camelpox virus. *Virology*. 2002; 295(1): 1–9. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1343>
11. OIE 2019. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. Chapter 3.9.2. Camelpox*. Paris: World Organisation for Animal Health; 2019: 1665–8.
12. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
13. Tantawi H.H., Saban M.S., Reda I.M., Dahaby H.E. Camel pox virus in Egypt. Isolation and characterization. *Bull. Epizoot. Dis. Africa*. 1974; 22(4): 315–9.
14. Chauhan R.S., Kaushik R.K. Isolation of camel pox virus in India. *Br. Vet. J.* 1987; 143(6): 581–2. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(87\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0007-1935(87)90050-9)
15. Marodam V., Nagendrakumar S.B., Tanwar V.K., Thiagarajan D., Reddy G.S., Tanwar R.K., et al. Isolation and identification of camel pox virus. *Indian J. Anim. Sci.* 2006; 76: 326–7.
16. Ramyar H., Hessami M. Isolation, cultivation and characterization of camel pox virus. *Arch. Inst. Razi*. 1972; 24: 13–21.
17. Davies F., Mungai J., Shaw T. Characteristics of a Kenyan camelpox virus. *J. Hyg. (Lond.)*. 1975; 75(3): 381–5. <https://doi.org/10.1017/s002217240002444x>
18. Gitao C.G., Nyaga P.N. Pathogenicity of Camelpox virus strain from Kenya on Camels (*Camelus dromedarius*). *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* 1995; 43: 247–51.
19. Klopries M., Wernery U., Karden O.-R. Characterisation of the camel skin cell line Dubca. *Br. Vet. J.* 1995; 151(5): 555–65. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80026-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80026-0)
20. Tantawi H.H., El-Dahaby H., Fanmy L.S. Comparative studies on poxvirus strains isolated from camels. *Acta Virol.* 1978; 22(6): 451–7.

REFERENCES

1. Satbekov E.S. Obtaining and testing for specific activity of hyperimmune serum against camel pox [*Poluchenie i ispytanie na spetsificheskuyu aktivnost' giperimmunnoy syvorotki protiv ospy verbyudov*]. *Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*. 1971; (2): 101–4. (in Russian)
2. Trabaev O. Results of the study of the resistance of the camel pox virus in various environmental conditions and under the influence of antibiotics and disinfectants. In: *Proceedings of the Alma-Ata ZVI. Volume XX: Infectious and Parasitic Diseases of Farm Animals [Rezultaty izucheniya ustoychivosti virusa ospy verbyudov v razlichnykh usloviyakh vneshey sredy i pri vozdeystvii antibiotikov i dezozredstv. V kn.: Trudy Alma-Atinskogo ZVI. Tom XX: Infektsionnye i parazitarnye zabolovaniya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh]*. Alma-Ata; 1972: 34–5. (in Russian)
3. Sadykov R.G. Cultivation of camel pox virus on chicken embryos [*Kul'tivirovaniye virusa ospy verbyudov na kurinykh embriionakh*]. *Virussye bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh*. 1970; (1): 1–25. (in Russian)

4. Bulatov E.A., Mamadaliev S.M., Mambetaliev M. Study of the main biophysical characteristics of the camel pox virus from the strain «M-96» [Izuchenie osnovnykh biofizicheskikh kharakteristik virusa ospy verbyudov iz shtamma «M-96»]. *Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo universiteta im. S. Seyfulina*. 2009; (4): 225–9. (in Russian)
5. Bulatov E.A., Mamadaliev S.M., Mambetaliev M., Bitov N.T. Circulation of the camel pox virus in Manghystaus Region, Republic of Kazakhstan, in the latent form [O tsirkulyatsii virusa ospy verbyudov v Mangistauskoy oblasti Respubliki Kazakhstan v skrytoy forme]. *Aktual'nye voprosy veterinarnoy biologii*. 2010; (3): 10–3. (in Russian)
6. Sultankulova K.T., Zaytsev V.L. *Camel Pox Virus: Biological Properties, Genome Structure and Diagnostics. Morphology and Structure of the Virus [Virus ospy verbyudov: biologicheskie svoystva, struktura genoma i diagnostika. Morfologiya i struktura virusa]*. Almaty; 2017: 37–40. (in Russian)
7. Syurin V.N. *Guide to Veterinary Virology [Rukovodstvo po veterinarnoy virusologii]*. Moscow: Kolos; 1966. (in Russian)
8. Sergeev V.A. *Reproduction of Animal Virus in Tissue Cells [Razmnozhenie virusa zivotnykh v kletkakh tkani]*. Moscow: Kolos; 1966. (in Russian)
9. Marennikova S.S., Shenkman L.S., Shelukhina E.M., Maltseva N.N. Isolation of camel pox virus and investigation of its properties. *Acta virologica*. 1974; 18(5): 423–8.
10. Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., Kerembekova Z.U., et al. The genome of camelpox virus. *Virology*. 2002; 295(1): 1–9. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1343>
11. OIE 2019. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. Chapter 3.9.2. Camelpox*. Paris: World Organisation for Animal Health; 2019: 1665–8.
12. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
13. Tantawi H.H., Saban M.S., Reda I.M., Dahaby H.E. Camel pox virus in Egypt. Isolation and characterization. *Bull. Epizoot. Dis. Africa*. 1974; 22(4): 315–9.
14. Chauhan R.S., Kaushik R.K. Isolation of camel pox virus in India. *Br. Vet. J.* 1987; 143(6): 581–2. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(87\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0007-1935(87)90050-9)
15. Marodam V., Nagendrakumar S.B., Tanwar V.K., Thiagarajan D., Reddy G.S., Tanwar R.K., et al. Isolation and identification of camel pox virus. *Indian J. Anim. Sci.* 2006; 76: 326–7.
16. Ramyar H., Hessami M. Isolation, cultivation and characterization of camel pox virus. *Arch. Inst. Razi*. 1972; 24: 13–21.
17. Davies F., Mungai J., Shaw T. Characteristics of a Kenyan camelpox virus. *J. Hyg. (Lond.)*. 1975; 75(3): 381–5. <https://doi.org/10.1017/s002217240002444x>
18. Gitao C.G., Nyaga P.N. Pathogenicity of Camelpox virus strain from Kenya on Camels (*Camelus dromedarius*). *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* 1995; 43: 247–51.
19. Klopries M., Wernery U., Karden O.-R. Characterization of the camel skin cell line Dubca. *Br. Vet. J.* 1995; 151(5): 555–65. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80026-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80026-0)
20. Tantawi H.H., El-Dahaby H., Fanmy L.S. Comparative studies on poxvirus strains isolated from camels. *Acta Virol.* 1978; 22(6): 451–7.