



В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Адаптация вируса оспы овец (Poxviridae: *Capripoxvirus: Sheeppox virus*) к линии клеток почки африканской зелёной мартышки и оценка его иммунобиологических свойств

Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Булатов Е.А.

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан

Введение. Вспышки инфекционных заболеваний серьёзно препятствуют сохранению и увеличению поголовья мелкого рогатого скота. К числу таких инфекций относится оспа овец. По данным Всемирной организации здравоохранения животных, в 2021 г. вспышки были зарегистрированы в таких странах, как Турция, Израиль, Китай, Мальдивы, Монголия, Таиланд, Россия, Алжир, Кения, а в 2019 г. в Мангистауской и Атырауской областях Казахстана. С целью предотвращения проникновения инфекции из соседних стран в республике ежегодно проводится плановая иммунизация овец группы риска живой аттенуированной вакциной производства Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись вакцинный штамм НИСХИ и вирулентный штамм А вируса оспы овец. Система культивирования вируса – культура клеток Vero. Для определения безвредности и иммуногенности использовали овец казахской тонкорунной породы в возрасте от 6 до 12 мес. При исследовании применяли вирусологические, серологические и иммунобиологические методы.

Результаты. Приведены результаты исследования по адаптации штамма НИСХИ вируса оспы овец к перевиваемой линии клеток Vero. Пятикратное пассирование на перевиваемой линии клеток Vero привело к адаптации штамма НИСХИ с проявлением цитопатогенного эффекта, специфичного для вируса оспы овец, с титром $6,50 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. При тестировании на овцах адаптированный к перевиваемой линии клеток Vero испытуемый штамм оказался для них безвредным и на 7-е сутки после иммунизации стимулировал формирование иммунитета против оспы овец у животных со средним значением защитного титра $1,8 \log_2$, которое увеличилось на 21-е сутки до $4,33 \log_2$.

Заключение. Установлено, что штамм НИСХИ вируса оспы овец сохраняет свои вирусологические и иммунобиологические свойства при репродукции в перевиваемой линии клеток Vero.

Ключевые слова: оспа овец; линия клеток Vero; пассаж; культивирование; безопасность

Для цитирования: Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Булатов Е.А. Адаптация вируса оспы овец (Poxviridae: *Capripoxvirus: Sheeppox virus*) к линии клеток почки африканской зелёной мартышки и оценка его иммунобиологических свойств. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 450-458. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

Для корреспонденции: Булатов Ербол Акенович, канд. биол. наук, заведующий лабораторией технологии культивирования микроорганизмов, РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: erbol_km@mail.ru

Участие авторов: Аманова Ж.Т. – анализ литературных данных, оформление статьи, проведение экспериментов, концепция и дизайн исследования; Саметова Ж.Ж. – проведение экспериментов, постановка серологических реакций; Булатов Е.А. – руководство, планирование, обработка результатов исследований, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» на 2022 г.

Благодарности. Авторы выражают признательность руководству РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан и сотрудникам лаборатории технологии культивирования микроорганизмов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией.

Этические утверждения. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан (протокол 1510/14).

Поступила 30.08.2022

Принята в печать 04.10.2022

Опубликована 31.10.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

Adaptation of the sheep pox virus (Poxviridae: *Capripoxvirus: Sheeppox virus*) to African green monkey kidney cell line and evaluation of its immunobiological properties

Zhanat T. Amanova, Zhanna Zh. Sametova, Yerbol A. Bulatov

Research Institute for Biological Safety Problems of Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan

Introduction. Outbreaks of infectious diseases seriously hinder the preservation and increase of the number of small ruminants. Such infections include sheep pox virus (SPPV). According to the OIE data of 2021, SPP outbreaks were registered in countries such as Turkey, Israel, China, Maldives, Mongolia, Thailand, Russia, Algeria, Kenya, and in 2019 in Mangistau and Atyrau regions. In Kazakhstan annually conducts routine immunization of sheep at risk with a live attenuated vaccine produced by RIBSP.

Materials and methods. The object of the study was the vaccine strain of NISHI and the virulent strain A of the sheep pox virus. The virus was propagated in Vero cells. To determine the harmlessness and immunogenicity, sheep of the Kazakh fine-wool breed aged from 6 to 12 months were used. Virological, serological and immunobiological methods were used in the study.

Results. The results of the adaptation of the NISHI strain of SPPV to the Vero cell line are presented. Five passages in Vero cells resulted to the adaptation of the NISHI strain with the manifestation of a cytopathogenic effect specific to SPPV with a titer of 6.50 lg TCD₅₀/ml. Following immunization, the formation of immunity was observed in animals on day 7 with an average protective titer 1.8 log₂, which increased by day 21 to 4.33 log₂.

Conclusion. It has been established that the NISHI strain of SPPV retains its virological and immunobiological properties during reproduction in a Vero cell line.

Keywords: *sheep pox; Vero cell line; passage; cultivation; safety*

For citation: Amanova Zh.T., Sametova Zh.Zh., Bulatov Ye.A. Adaptation of the sheep pox virus (Poxviridae: *Capripoxvirus: Sheeppox virus*) to African green monkey kidney cell line and evaluation of its immunobiological properties. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 450-458 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

For correspondence: Yerbol A. Bulatov, PhD (Biol.), Head of the Laboratory of Technology of cultivation of Microorganisms, Research Institute for Biological Safety Problems of Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan. E-mail: erbol_km@mail.ru

Information about the authors:Amanova Zh.T., <https://orcid.org/0000-0002-3987-6814>Sametova Zh.Zh., <https://orcid.org/0000-0002-2332-2841>Bulatov Ye.A., <https://orcid.org/0000-0001-8543-4219>

Contribution: Amanova Zh.T. – analysis of literary data, design of the article, conducting experiments, concept, and design of the study; Sametova Zh.Zh. – conducting experiments, staging serological reactions; Bulatov Ye.A. – management, planning, processing of research results, approval of the final version of the article for publication.

Funding. The work was carried out within the framework of the state task «Biological safety services in the field of science» for 2022.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the management of the Research Institute of Biological Safety Problems and the staff of the Laboratory of Microbial Cultivation Technology.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication.

Ethical approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The protocol of the study was approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments of the Research Institute of Biological Safety Problems of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (protocol 1510/14).

Received 30 August 2022

Accepted 04 October 2022

Published 31 October 2022

Введение

Животноводство является одной из важнейших отраслей агропромышленного комплекса Республики Казахстан (РК) и вносит значительный вклад в национальную экономику. С каждым годом поголовье овец в стране увеличивается, что делает оптимальное содержание этих животных чрезвычайно важным. Однако внезапные вспышки инфекционных заболеваний серьёзно препятствуют сохранению и увеличению поголовья мелкого рогатого скота (МРС), повышению продуктивности и улучшению качества продукции, оказывая значительное влияние на экономику страны. К числу таких инфекционных заболеваний МРС относится оспа овец (ОО).

ОО является одной из наиболее распространённых инфекционных болезней среди МРС, классифицированных Всемирной организацией здравоохранения животных (Международное эпизоотическое бюро – МЭБ) как заболевание, подлежащее уведомлению. Болезнь эндемична в Африке (к северу от экватора), на Ближнем Востоке, в Центральной Азии и на Индийском субконтиненте [1, 2]. ОО оказывает значительное влияние на продуктивность МРС из-за снижения удоя молока, повреждения шкур и смертности [3, 4]. Смертность у молодых животных может превышать 50%, а иногда достигать и 100% [5, 6].

По данным МЭБ, в 2021 г. вспышки ОО были зарегистрированы в таких странах, как Турция, Израиль, Китай, Мальдивы, Монголия, Таиланд, Россия, Алжир, Кения, Коморские острова, Тунис и Уганда [7].

Следует отметить, что в 2019 г. в сельском округе Кызылтоз Тупкарагайского района Мангистауской области, а также в селе Сундук Курмангазинского района Атырауской области РК были зарегистрированы вспышки оспы МРС. Благодаря экстренным мерам, принятым ветеринарными службами РК, инфекцию удалось локализовать [8]. Борьба с этим заболеванием жизненно важна для повышения продуктивности МРС. Для профилактики ОО доступны различные типы вакцин, но живая аттенуированная вакцина является лучшим выбором, так как она обеспечивает длительный иммунитет [9]. Использование инактивированной вакцины имеет целый ряд недостатков, таких как высокие дозы и короткая продолжительность иммунитета [10].

Овец в основном иммунизируют живыми вакцинами из аттенуированных штаммов Romania, Bakirkoy, RM65, KSGP O-240 и KSGP O-180. В Северной Африке и на Ближнем Востоке для защиты овец от оспы в основном используется румынский штамм, в то время как в Восточной Африке обычно используются KSGP O-240 и KSGP O-180. В Турции вакцинация овец проводится с использованием штамма Bakirkoy, в то время как в Иране – RM65 [11]. В странах СНГ широко используются штаммы НИСХИ, Б/5-96 и ВНИИЗЖ вируса ОО [12].

Ветеринарная служба РК с целью предотвращения проникновения ОО из соседних или отдалённых стран ежегодно проводит плановую профилактическую иммунизацию овец группы риска живой аттенуированной вакциной против названной инфекции из штам-

ма НИСХИ производства Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) РК. Согласно технологии производства данной вакцины, балк-продукт получают путём культивирования вакцинного штамма НИСХИ в первично-трипсинизированной культуре клеток почки ягнёнка. Однако системы первичных и диплоидных клеточных культур в настоящее время заменяются использованием перевиваемых клеточных линий. Эти субстраты получают всё большее признание в биотехнологии, поскольку улучшенные технологии скрининга устраняют опасения относительно их потенциальных онкогенных свойств [13]. В то же время современные требования, предъявляемые к эффективности и безопасности ветеринарных препаратов, а также их качественному производству с соблюдением правил GMP (Good Manufacturing Practice – Надлежащая производственная практика) приводят к совершенствованию технологий изготовления вакцинных препаратов, производство которых сводится к культивированию высокоиммуногенных вакцинных штаммов различных вирусов в перевиваемой клеточной линии [14–18].

В связи с этим с целью устранения негативных явлений, связанных с затратами на получение промышленных серий клеточной культуры почки ягнёнка, в качестве клеточного субстрата для культивирования производственного штамма НИСХИ была выбрана перевиваемая клеточная линия Vero. Она является наиболее известной перевиваемой клеточной линией, предназначенной для производства вирусных вакцин для медицинского и ветеринарного применения.

Целью данной исследовательской работы является адаптация штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero.

Материалы и методы

Штаммы

Использован аттенуированный вакцинный штамм НИСХИ вируса ОО с инфекционной активностью $10^{5.5}$ lg ТЦД₅₀/мл. Штамм депонирован в коллекции микроорганизмов НИИПББ (РК).

Вирулентный штамм А вируса ОО в виде органо-тканевого лиофилизированного материала был получен из лаборатории коллекции микроорганизмов НИИПББ (РК).

Культура клеток

Адаптация вакцинного штамма НИСХИ вируса ОО и титрование вирусных материалов были проведены в культуре клеток Vero, полученной из лаборатории клеточной биотехнологии НИИПББ (РК).

Животные и их подготовка к опыту

В опытах использовались овцы тонкорунной казахской породы в возрасте от 6 до 12 мес. с живой массой 18–20 кг, доставленные из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям, и серонегативных к вирусу ОО.

Перед постановкой экспериментов на животных была проведена их идентификация. Идентифициро-

ванные животные были помещены на карантин в течение 1 мес. с термометрией, клиническим обследованием и анализом сыворотки крови на наличие специфических антител к вирусу ОО в соответствии с методом OIE (Office International des Epizooties – МЭБ) [19]. В опыте использовались животные, у которых не было обнаружено специфических антител к вирусу ОО и без истории вакцинации против этой инфекции.

Эксперименты проводились в специально оборудованных помещениях для животных ABSL-2 (Animal Biosafety Level 2). По прибытии в помещения для животных НИИПББ овец пронумеровали и оставили для акклиматизации в течение 2 нед. до начала эксперимента. Каждая группа была помещена в отдельную комнату без прямого контакта друг с другом. Подопытные животные имели свободный доступ к воде и пище на протяжении всего эксперимента.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан (протокол 1510/14).

Адаптация штамма НИСХИ к перевиваемой линии клеток Vero

Для адаптации штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero проведено 10 последовательных пассажей вируса на данной культуре. В процессе работы культуры клеток Vero, выращенные на матрасах площадью 300 см², были инфицированы вирусом ОО в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл. В качестве поддерживающей питательной среды использована среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащая 2% фетальной бычьей сыворотки. Инфицированные культуры клеток ежедневно контролировались с помощью светового микроскопа для обнаружения характерных к вирусу ОО цитопатических изменений в монослое клеток. В качестве контроля были использованы неинфицированные матрасы с культурой клеток из этой же партии, в которых через двое суток была проведена смена питательной среды.

По достижении цитопатического действия в монослое культуры клеток Vero на 85–90% матрасы подвергались двум циклам замораживания/оттаивания в пределах от –40 °С до комнатной температуры. Сбор вирусосодержащих материалов (ВСМ) каждого пассажа проводился в стерильные флаконы в асептических условиях. Одновременно из каждого флакона с ВСМ отбирались пробы для определения биологической активности вируса в соответствии с методом Ж.Т. Амановой и соавт. [20]. Титр вируса был рассчитан с использованием метода I.J. Reed и H.A. Muench и был указан в lg ТЦД₅₀/см³ [21]. Стерильность ВСМ каждого пассажа была определена согласно ГОСТ 28085-2013 [22].

Определение специфичности штамма НИСХИ

Специфичность штамма НИСХИ, адаптированного к клеточной линии Vero, определялась проявлением цитопатических изменений, специфичных для вируса ОО, а также с использованием классической тест-системы ПЦР (полимеразная цепная реакция) [23].

Лиофилизация штамма НИСХИ

ВСМ был объединён с комбинацией стабилизирующей среды (пептон – сахароза в конечной концентрации 3–5%) в соотношении 1 : 1 с последующим добавлением антибиотиков (пенициллин 500 000 ЕД и стрептомицин 0,5 г на 1 дм³ смеси). Полученный балк-продукт был разлит в стерильные ампулы по 1,0 см³ с помощью вакуумного шприца и высушен методом лиофилизации согласно методике Ж.Т. Амановой и соавт. [24].

Оценка безвредности штамма НИСХИ

Штамм НИСХИ был протестирован на овцах (3 головы) путём подкожной инъекции штамма в дозе 10⁵ ТЦД₅₀/мл в объёме 1,0 см³. Контрольные животные (3 головы) были иммунизированы по 1,0 см³ подкожно фосфатно-солевым буфером (PBS). Испытуемые животные ежедневно наблюдались клинически, проводился осмотр места аппликации и общего состояния животных с измерением ректальных температур в течение 14 сут.

Вакцинный штамм считался безвредным, если он не вызывал гибели овец и каких-либо клинических признаков заболевания и патологических изменений в месте введения вакцины в течение 14 сут. В то же время у некоторых овец допускалось повышение температуры тела до 41,0 °С в течение 1–4 сут, а у некоторых животных (до 20%) – образование воспалительного отёка в месте инъекции в виде уплотнений (в течение 3–5 сут).

Оценка иммуногенности штамма НИСХИ

Для определения иммуногенности штамма НИСХИ были сформированы 3 экспериментальные группы по 3 головы и 3 контрольные группы по 2 головы овец в каждой. Экспериментальные группы животных были иммунизированы в подмышечную область испытываемым штаммом в дозе 1000 ТЦД₅₀ в объёме 1,0 см³. На 7, 14 и 21-е сутки после введения штамма у животных были отобраны образцы крови для определения титра сывороточных антител к вирусу ОО. В течение вышеупомянутых периодов экспериментальным и контрольным животным внутрикожно в область подхвостовой складки вводился вирулентный штамм А вируса ОО в дозе 1000 ИД₅₀. Экспериментальные овцы клинически наблюдались в течение 14 сут с ежедневной термометрией.

Иммуногенность штамма НИСХИ оценивали в реакции нейтрализации по наличию антител к вирусу ОО [20], а также по результатам контрольных заражений вирулентным штаммом ОО.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистический анализ проводился с использованием Prism 8.0.1 Release Notes от GraphPad. Результаты серологического теста после вакцинации обеими вакцинами, а также разница между группами после заражения контрольным вирусом были проанализированы с помощью двустороннего теста ANOVA. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым. Разница в эффективности между группами вычислялась с помощью одностороннего точного критерия Фишера для двух пропорций при уровне значимости $\alpha < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе работы по адаптации штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero было проведено 10 последовательных пассажей (рис. 1). Начиная с первого пассажа, наблюдалось размножение вируса ОО, однако в первых двух пассажах признаки деструктивных изменений клеток проявлялись на 3-и сутки культивирования, тогда как в остальных пассажах первые признаки цитопатических клеточных из-

менений, характерные для вируса ОО, были отмечены на 2-е сутки культивирования. На 5–6-е сутки культивирования вируса ОО 80–90% клеточного пласта было им разрушено, при этом цитопатогенное действие вируса проявлялось в виде округлых клеток, которые впоследствии образовали очаги и на 5–6-е сутки культивирования отделились от стенок матраса, образуя окошки (рис. 2).

Биологическая активность штамма НИСХИ постепенно повысилась до 5-го пассажа. В последующих пассажах (от 6-го до 10-го) титр вируса ОО колебался от 6,17 до 6,33 lg ТЦД₅₀/мл. В то же время ВСМ ОО с наибольшей активностью был получен на 5-м пассаже с титром 6,50 lg ТЦД₅₀/мл, тогда как ВСМ ОО с наименьшей активностью был получен на начальном пассаже с титром 5,50 lg ТЦД₅₀/мл.

На основании полученных результатов исследований для последующих экспериментов использовали ВСМ, полученный на 5-м пассаже с титром 6,50 lg ТЦД₅₀/мл.

Для определения специфичности штамма НИСХИ, адаптированного к клеточной линии Vero, использо-

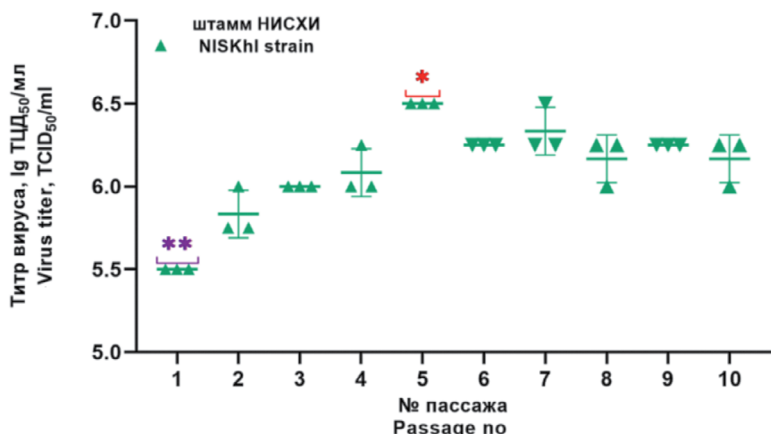


Рис. 1. Динамика накопления инфекционной активности штамма НИСХИ в культуре клеток Vero.

*Максимальный титр вируса. **Минимальный титр вируса.

Fig. 1. Dynamics of accumulation of the NISHI strain in Vero cell culture. *Maximum virus titer. **Minimum virus titer.

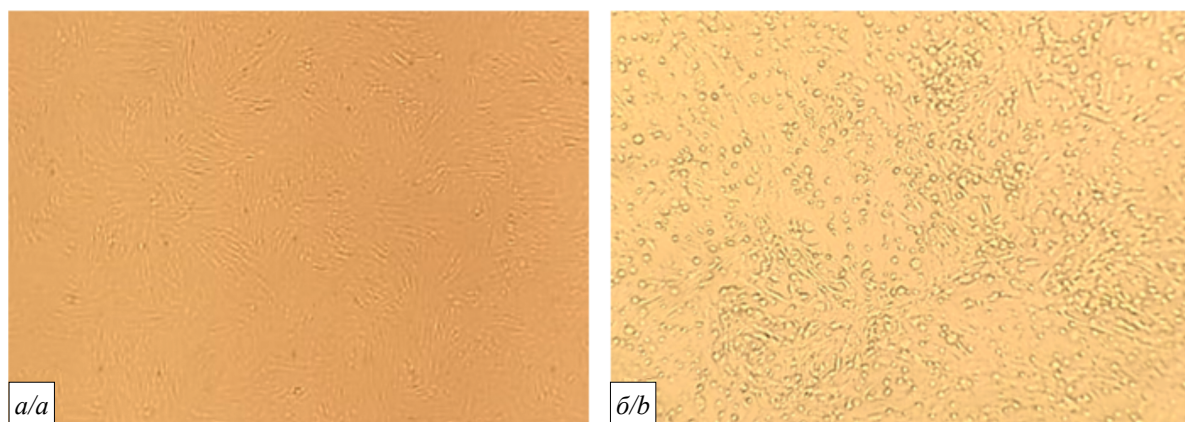


Рис. 2. Цитопатическое действие вируса оспы овец на культуре клеток Vero: а – контрольная культура клеток Vero; б – инфицированная вирусом оспы овец культура клеток Vero.

Fig. 2. Cytopathic action of the sheep pox virus on Vero cell culture: a – control culture of Vero cells; b – Vero cell culture infected with sheep pox virus.

Таблица 1. Результаты ПЦР-исследования на наличие вируса оспы овец в пробах вирусосодержащих материалов

Table 1. Results of a PCR testing for sheep pox virus in samples of virus-containing material

Исследуемый агент Research material	Пассажный уровень Passage	Наличие ДНК вируса оспы овец The presence of the DNA of the sheep pox virus
Штамм НИСХИ вируса оспы овец Strain NISHI of sheep pox virus	1-й	+
	2-й	+
	3-й	+
	4-й	+
	5-й	+
	K ⁺	+
	K ⁻	-

Примечание. K⁺ – положительный контроль; K⁻ – отрицательный контроль; «+» – положительный; «-» – отрицательный.

Note/ K⁺ – positive control; K⁻ – negative control; «+» – positive; «-» – negative.

вали пробы ВСМ ОО, полученные до 5-го пассажа. Результаты представлены в табл. 1.

ДНК вируса была обнаружена во всех пробах ВСМ ОО. Следовательно, во время пассирования вируса ОО на культуре клеток Vero были получены ВСМ, специфичные для данного вируса.

Лиофилизация штамма НИСХИ, адаптированного к линии клеток Vero

ВСМ ОО (100 мл) с биологической активностью 6,50 lg ТЦД₅₀/мл, полученный на 5-м пассажном уровне, объединяли с комбинацией стабилизирующей среды «пептон – сахароза» (в конечной концентрации 3–5% соответственно) в соотношении 1 : 1, добавляли антибиотики (пенициллин 50 000 ЕД и стрептомицин 0,05 г на 100 см³ смеси) и разливали в стерильные ампулы по 1,0 см³ с помощью вакуумного шприца. После готовый балк-продукт высушивали методом лиофилизации. Биологические и физические характеристики лиофилизированного штамма НИСХИ представлены в табл. 2.

Таким образом, был получен стерильный лиофилизированный штамм НИСХИ, адаптированный

Таблица 2. Биологические и физические характеристики лиофилизированного штамма НИСХИ

Table 2. Biological and physical characteristics of the lyophilized NISKHI strain

Наименование вируса Name of the virus	Титр вируса после лиофилизации, lg ТЦД ₅₀ /мл Virus titer after lyophilization, lg TCD ₅₀ /ml	Стерильность лиофилизированного штамма Sterility of the lyophilized strain	Физические показатели вакцины после лиофилизации Physical parameters of the vaccine after lyophilization
Штамм НИСХИ вируса оспы овец NISHI strain of sheep pox virus	6,25 ± 0,00	–	Однородная таблетка светло-коричневого цвета Homogeneous tablet of light brown color

Примечание. «-» – стерильно.

Note. «-» – sterile.

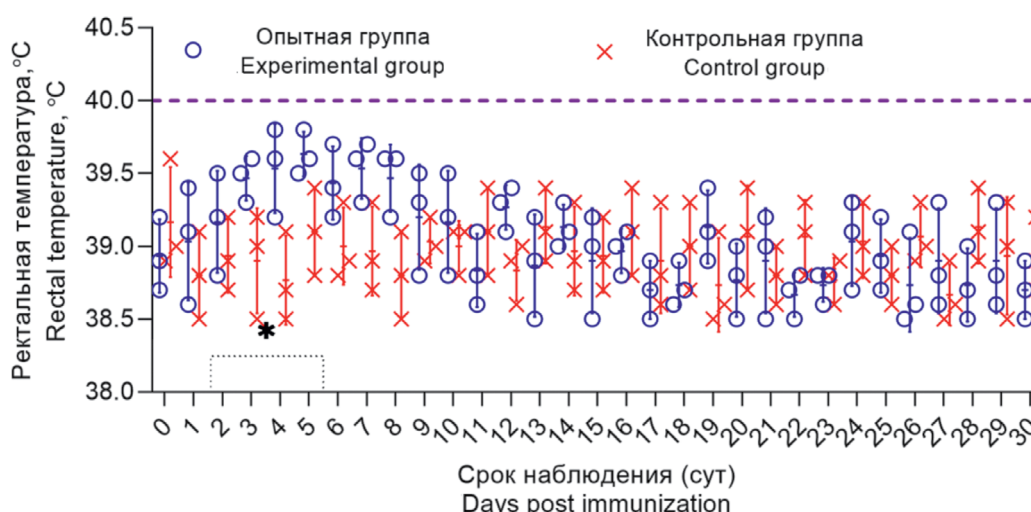


Рис. 3. Динамика ректальной температуры овец, иммунизированных штаммом НИСХИ вируса оспы овец.

*Местные реакции, возникшие после введения штамма у 3 овец, наблюдались в течение 5 сут.

Fig. 3. Dynamics of rectal temperature of sheep immunized with the NISHI strain of the sheep pox virus.

*Local reactions that appeared post immunization in 3 sheep were observed for 5 days.

к культуре клеток Vero, с биологической активностью 6,25 lg ТЦД₅₀/мл.

Оценка безвредности штамма НИСХИ, адаптированного к линии клеток Vero

Подкожное введение вируса ОО в бесшёрстный участок подмышечной области в исходном разведении по 1,0 см³ в дозе 10⁵ ТЦД₅₀/мл не вызывало заболевания и гибели овец в течение 30 сут. Ректальная температура иммунизированных овец была в преде-

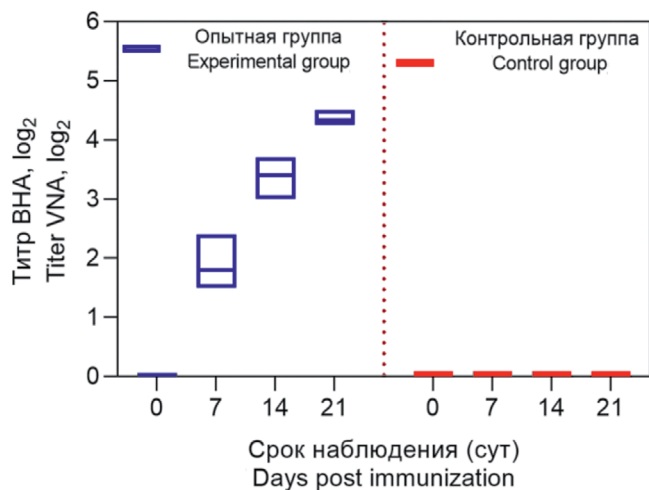


Рис. 4. Титры вируснейтрализующих антител у овец, привитых штаммом НИСХИ, по сравнению с контрольными животными.

Fig. 4. Virus neutralizing antibody titers in sheep immunized with the NISHI strain compared to control animals.

лах нормы (рис. 3). Лишь у 3 из 5 овец после вакцинации наблюдались местные реакции в виде уплотнения, которые самостоятельно рассосались в течение 4 сут.

Таким образом, штамм НИСХИ вируса ОО, адаптированный к перевиваемой культуре клеток Vero, является безвредным для овец.

Оценка иммуногенности штамма НИСХИ, адаптированного к линии клеток Vero

Через 7, 14 и 21 день после введения штамма НИСХИ в экспериментальных группах животных титр нейтрализующих антител к гомологичным агентам находился в диапазоне 1,8–4,33 log₂. В крови контрольных овец антитела к вирусу ОО отсутствовали (рис. 4).

В результате контрольного заражения обеих групп овец вирулентным штаммом А вируса ОО установлено, что овцы опытной группы проявляют устойчивость к вирусу ОО в течение 2 нед. При этом животные оставались здоровыми, за исключением припухлостей у 3 овец в месте инъекции вирулентного вируса размером 1,0 × 1,2 см, которые рассосались через 3–4 дня после заражения. Температура тела овец была в пределах физиологической нормы (рис. 5).

У контрольных животных первичные клинические поражения с развитием местной реакции в виде отёка плотной консистенции размером до 4 × 5 см начались на 2–3-й день после контрольного заражения. На 5-е сутки ректальная температура инфицированных овец достигла 40,8 °С. Пик пирексии (> 41,2 °С) был отмечен на 7-е сутки после заражения. Ректальная температура у больных животных начала нормализовыв-

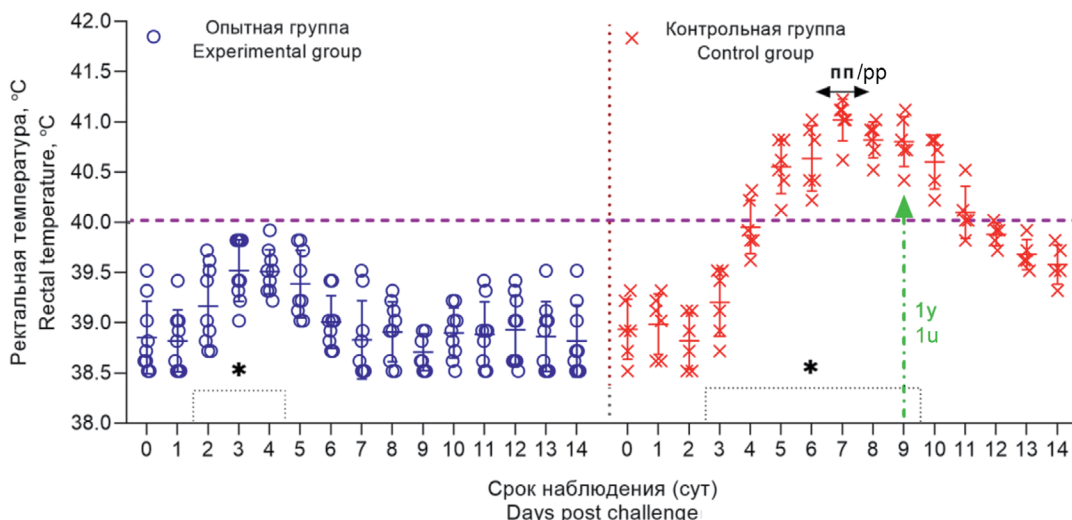


Рис. 5. Динамика изменения ректальной температуры овец опытной и контрольной групп после контрольного заражения вирулентным штаммом А вируса оспы овец.

Пунктирная линия на графике показывает верхний предел нормальной температуры тела; **пп** – пик пирексии у контрольных овец; **1у** – на 9-е сутки одна овца усыплена в связи с ухудшением общего состояния.

*Срок местных реакций, возникшие после инфицирование овец опытной и контрольной групп.

Fig. 5. Dynamics of changes in body temperature of sheep in experimental and control groups after control infection with virulent strain A of the SPP virus.

The dotted line in the graph shows the upper limit of the normal body temperature; **pp** – peak pyrexia in control sheep; **1u** – on day 9 post challenge one sheep in the control group was humanely euthanized due to the deterioration of the general condition.

*The duration of local reactions that occurred after infection in sheep from the experimental and control groups.

ваться на 11–12-е сутки после контрольных испытаний (рис. 5).

На 5-е сутки одновременно с лихорадкой у всех подопытных животных наблюдались водянистые и слизисто-гнойные выделения из глаз и носа, а также поражения кожи (красные высыпания) диаметром 0,5–0,7 см на внутренней поверхности кожи передних и задних конечностей, коже вымени. У большинства больных животных (70%) наблюдалась потеря аппетита. На 9-е сутки одна овца контрольной группы (отобранная на 21-е сутки) была гуманно усыплена после контрольного заражения в связи с ухудшением общего состояния. В дополнение к вышеуказанным клиническим признакам у вынужденно усыпленной овцы наблюдались затрудненное дыхание, периодический кашель, а также умеренная депрессия. Выздоровевшие животные (5 голов) по истечении срока контрольных испытаний (14 сут) были обработаны антибиотиками и содержались в карантине до полного выздоровления.

Таким образом, было установлено, что штамм НИСХИ, адаптированный к перевиваемой культуре клеток Vero, при однократной иммунизации формирует у овец напряжённый иммунитет, обеспечивающий надёжную защиту от ОО.

Заключение

Анализируя полученные данные, можно заключить, что штамм НИСХИ сохраняет свои вирусологические и иммунобиологические свойства при репродукции в перевиваемой линии клеток Vero, что позволяет использовать данную клеточную линию для культивирования штамма НИСХИ при изготовлении профилактического препарата против ОО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boumart Z., Daouam S., Belkourati I., Rafi L., Tuppurainen E., Tadlaoui K.O., et al. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines. *BMC Vet. Res.* 2016; 12(1): 133. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0754-0>
2. Yogisharadhya R., Bhanuprakash V., Hosamani M., Venkatesan G., Balamurugan V., Bora D.P., et al. Comparative efficacy of live replicating sheeppox vaccine strains in Ovines. *Biologicals.* 2011; 39(6): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.09.010>
3. Yeraham I., Yadin H., Van Ham M., Bumbarov V., Soham A., Perl S. Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *Vet. Rec.* 2007; 160(7): 236–7. <https://doi.org/10.1136/vr.160.7.236>
4. Yune N., Abdela N. Epidemiology and economic importance of sheep and goat pox: a review on past and current aspects. *J Vet. Sci. Technol.* 2017; 8(2): 430. <https://doi.org/10.4262/2157-7579.1000430>
5. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hosamani M., Singh R.K. The current status of sheep pox disease. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 29(1): 27–60. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.12.001>
6. Парилов С.В., Книзе А.В., Балышев В.М. Анализ и прогноз мировой эпизоотической ситуации по оспе овец и коз и чуме мелких жвачных животных в 2011–2015 гг.: научное издание. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.* 2011; (69): 423–32.
7. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). Эпизоотическая ситуация в мире по данным МЭБ. Available at: <https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/foreign.html>

8. OIE. World Organization for Animal Health. Information received on 04/05/2019 from Committee for Veterinary Control and Supervision. Nur-Sultan, Kazakhstan: Ministry of Agriculture; 2019.
9. Tuppurainen E., Babiuk S., Klement E. *Lumpy Skin Disease.* Berlin/Heidelberg: Springer International Publishing AG; 2018.
10. Awad M., Michael A., Soliman S.M., Samir S.S., Daoud A.M. Trials for preparation of inactivated sheep pox vaccine using binary ethyleneimine. *Egypt. J. Immunol.* 2003; 10(2): 67–72.
11. Hamdi J., Munyanduki H., Omari Tadlaoui K., El Harrak M., Fassi Fihri O. Capripoxvirus infections in ruminants: a review. *Microorganisms.* 2021; 9(5): 902. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050902>
12. Балышев В.М., Калантаенко Ю.Ф., Горшкова Т.Ф., Парилов С.В. Ассоциированная вакцина против оспы овец и чумы мелких жвачных животных. Патент РФ 2406535 C1; 2010.
13. Barrett P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(5): 607–18. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
14. Trabelsi K., Majoul S., Rourou S., Kallel H. Process intensification for an enhanced replication of a newly adapted RM-65 sheep pox virus strain in Vero cells grown in stirred bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 2014; 90: 131–9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.001>
15. Montagnon B., Vincent-Falquet J.C., Fanget B. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 1984; 55: 37–42.
16. Trabelsi K., Rourou S., Loukil H., Majoul S., Kallel H. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. *J. Biotechnol.* 2006; 121(2): 261–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.018>
17. Rourou S., van der Ark A., Majoul S., Trabelsi K., van der Velden T.T., Kallel H. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 85(1): 53–63. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2064-y>
18. Srivastava A.K., Putnak J.R., Lee S.H., Hong S.P., Moon S.B., Barvir D.A., et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. *Vaccine.* 2001; 19(31): 4557–65. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00208-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00208-0)
19. *Testerial Manual. Chapter 3.7.12. Sheep Pox and Goat Pox.* OIE; 2018: 1513–24.
20. Аманова Ж.Т., Таранов Д.С., Ершебулов З.Д., Жугунисов К.Д., Баракбаев К.Б., Булатов Е.А. и др. Оценка эффективности ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец. *Ветеринария.* 2016; (9): 21–4.
21. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7.
22. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы контроля стерильности; 2014.
23. Зайцев В.Л., Сандыбаев Н.Т., Султанкулова К.Т., Белоусов В.Ю., Червякова О.В., Строчков В.М. *Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома.* Алматы; 2011.
24. Аманова Ж.Т., Жугунисов К.Д., Булатов Е.А., Жунушов А.Т., Саметова Ж.Ж., Шаяхметов Е.А. и др. Оценка эффективности стабилизирующих сред при лиофилизации и хранении ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец. *Известия Национальной академии наук Кыргызской Республики.* 2020; (2): 25–34.

REFERENCES

1. Boumart Z., Daouam S., Belkourati I., Rafi L., Tuppurainen E., Tadlaoui K.O., et al. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines. *BMC Vet. Res.* 2016; 12(1): 133. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0754-0>
2. Yogisharadhya R., Bhanuprakash V., Hosamani M., Venkatesan G., Balamurugan V., Bora D.P., et al. Comparative efficacy of live replicating sheeppox vaccine strains in Ovines. *Biologicals.* 2011; 39(6): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.09.010>
3. Yeraham I., Yadin H., Van Ham M., Bumbarov V., Soham A., Perl S. Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *Vet. Rec.* 2007; 160(7): 236–7. <https://doi.org/10.1136/vr.160.7.236>

4. Yune N., Abdela N. Epidemiology and economic importance of sheep and goat pox: a review on past and current aspects. *J Vet. Sci. Technol.* 2017; 8(2): 430. <https://doi.org/10.4262/2157-7579.1000430>
5. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hosamani M., Singh R.K. The current status of sheep pox disease. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 29(1): 27–60. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.12.001>
6. Parilov S.V., Knize A.V., Balyshv V.M. Worldwide distribution analysis & prognosis for sheep & goat pox and peste des petits ruminants in 2011–2015. *Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* 2011; (69): 423–32. (in Russian)
7. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhozadzor). The epizootic situation in the world according to the OIE. Available at: <https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/foreign.htm>
8. OIE. World Organization for Animal Health. Information received on 04/05/2019 from Committee for Veterinary Control and Supervision. Nur-Sultan, Kazakhstan: Ministry of Agriculture; 2019.
9. Tuppurainen E., Babiuk S., Klement E. *Lumpy Skin Disease.* Berlin/Heidelberg: Springer International Publishing AG; 2018.
10. Awad M., Michael A., Soliman S.M., Samir S.S., Daoud A.M. Trials for preparation of inactivated sheep pox vaccine using binary ethyleneimine. *Egypt. J. Immunol.* 2003; 10(2): 67–72.
11. Hamdi J., Munyanduki H., Omari Tadlaoui K., El Harrak M., Fassi Fihri O. Capripoxvirus infections in ruminants: a review. *Microorganisms.* 2021; 9(5): 902. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050902>
12. Balyshv V.M., Kalantaenko Yu.F., Gorshkova T.F., Parilov S.V. Combined vaccine against sheep pox and peste des petits ruminants. Patent RF 2406535 S1; 2010. (in Russian)
13. Barrett P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(5): 607–18. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
14. Trabelsi K., Majoul S., Rourou S., Kallel H. Process intensification for an enhanced replication of a newly adapted RM-65 sheep pox virus strain in Vero cells grown in stirred bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 2014; 90: 131–9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.001>
15. Montagnon B., Vincent-Falquet J.C., Fanget B. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 1984; 55: 37–42.
16. Trabelsi K., Rourou S., Loukil H., Majoul S., Kallel H. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. *J. Biotechnol.* 2006; 121(2): 261–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.018>
17. Rourou S., van der Ark A., Majoul S., Trabelsi K., van der Velden T.T., Kallel H. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 85(1): 53–63. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2064-y>
18. Srivastava A.K., Putnak J.R., Lee S.H., Hong S.P., Moon S.B., Barvir D.A., et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. *Vaccine.* 2001; 19(31): 4557–65. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00208-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00208-0)
19. *Testerial Manual. Chapter 3.7.12. Sheep Pox and Goat Pox.* OIE; 2018: 1513–24.
20. Amanova Zh.T., Taranov D.S., Ershebulov Z.D., Zhugunisov K.D., Barakbaev K.B., Bulatov E.A., et al. Evaluation of associated vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox. *Veterinariya.* 2016; (9): 21–4. (in Russian)
21. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7.
22. GOST 28085-2013. Biological medicinal products for veterinary use. Methods of sterility control; 2014. (in Russian)
23. Zaytsev V.L., Sandybaev N.T., Sultankulova K.T., Belousov V.Yu., Chervyakova O.V., Stochkov V.M. *Sheep Pox Virus: Molecular Biological Properties and Genome Structure [Virus ospy ovets: molekulyarno-biologicheskie svoystva i struktura genoma].* Almaty; 2011. (in Russian)
24. Amanova Zh.T., Zhugunisov K.D., Bulatov E.A., Zhunushov A.T., Sametova Zh.Zh., Shayakhmetov E.A., et al. Evaluation of the effectiveness of stabilizing media during lyophilization and storage of the associated vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Kyrgyzskoy Respubliki.* 2020; (2): 25–34. (in Russian)