

ВЫБОР ШТАММОВ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ ЯЩУРА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ

Бурашев Е.Д. , Орынбаев М.Б. , Абеуов Х.Б. , Султанкулова К.Т.* , Тулендибаев А.Б. , Омарова З.Д. , Аргимбаева Т.У. , Ермекбай Т.Т. , Әубәкір Н.А. 

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», п.г.т. Гвардейский Кордайского района Жамбылской области, 080409
abeuov_khairulla@mail.ru.

АБСТРАКТ

Ящур – широко известная трансграничная болезнь животных, признанная Руководящим комитетом Глобальной рамочной программы по прогрессивному контролю с трансграничными болезнями животных в Европе в качестве приоритетного заболевания.

Территория Республики Казахстан в основном благополучна по ящуру, однако спорадические случаи ящура возникают в различных регионах страны в результате заноса из неблагополучных стран. Эпизоотическое благополучие в Республике Казахстан поддерживается благодаря вакцинации животных в приграничных районах южных и восточных областей. Для вакцинации используются инактивированные вакцины против серотипов А, О, Азия производства ВНИИЗЖ (Россия).

Проводится постоянный серомониторинг для поддержания уровня поствакцинальных антител на высоком уровне, обеспечивающем невосприимчивость животных к ящуру. Но, несмотря на все проводимые мероприятия, спорадические вспышки ящура наносят ущерб животноводству РК.

Эффективность профилактических мероприятий с использованием вакцинации зависит от штамма, используемого в составе вакцины. Чем ближе генетически штамм, используемый в составе вакцины, к циркулирующим на той местности вирусам тем эффективнее будут профилактические мероприятия и проводимые исследования по созданию наиболее иммуногенных отечественных противоящурных вакцинных препаратов имеют научную и практическую значимость.

В данной статье представлены результаты выбора штаммов вируса ящура, ранее циркулировавших на территории РК и изучены их культурально-биологические свойства. Были проведены исследования вышеперечисленных штаммов по адаптации на перевиваемой линии культур клеток, изучена стабильность культуральных свойств на протяжении 10 генераций и подтверждена стабильность методом ПЦР. Также на основании проведенных исследований установлено, что максимальное накопление вируса в культуре клеток происходит при множественности заражения 0,01-0,1 ТЦД_{50/кл.} Репродуктивная активность исследуемых изолятов была в пределах 6,5-7,25 lg ТЦД_{50/см³} при культивировании в течение 16 часов.

Ключевые слова: изоляты ящура, чувствительная система культивирования, биологическая активность изолятов ящура, цитопатический эффект, ПЦР, эпизоотическая ситуация.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – трансграничная, высококонтагиозное вирусное заболевание парнокопытных животных, которое вызывается одноцепочным РНК-вирусом, относящееся к семейству *Picornaviridae*. Ящур имеет семь серотипов А, О, С, Азия-1, SAT1, SAT2, SAT3, которые распространены по всему миру. Ящур поражает синантропных парнокопытных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы, козы и свиньи [1], а также многих диких животных, таких как импала [2] и горные газели [3]. Передача происходит при контакте с зараженными животными, их выделениями и экскрементами, продуктами животного происхождения, аэрозольные капли и механические векторы [4, 5]. Ящур оказывает сильное влияние на животноводство и влечет за собой большой экономический ущерб, складывающиеся из снижения надоев молока, ухудшением кожаного сырья, потерей производительности и препятствуя международной торговле животными и продуктами животного происхождения. Болезнь циркулирует среди 77 % мирового поголовья скота: в Африке, на Ближнем Востоке и в Азии, а также на ограниченной территории в Южной Америке [6, 7].

Территория Республики Казахстан считалась благополучной по ящуру. При этом в 2015 г. девять областей на западе, в центре и на севере были признаны зоной, свободной от ящура без вакцинации. А в 2017 г. еще пять регионов на юге и востоке получили статус свободных от ящура с вакцинацией.

Согласно опубликованной литературе некоторых авторов лучшим выбором для заключения о перекрестной защите будет поиск вакцины, которая индуцирует самый высокий титр вируснейтрализующих антител против левого вируса [8].

Для успешного контроля и повышения эффективности в борьбе с данной болезнью необходимо разработать отечественную поливалентную вакцину на основе штаммов, циркулирующих на территории Казахстана в сочетании с тотальным контролем за перемещением животных по республике.

Целью исследований явилось выбор штаммов и культивирование вирусов ящура для разработки трехвалентной инактивированной вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы вируса ящура. В работе использовали штаммы вируса ящура: FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012; FMD/A/Iran-05/KZ/Moinkum/2014 и FMD/Asia-1/KGZ/10/2007.

В качестве системы культивирования использовали перевиваемые линии культуры клеток ВНК-21 (С-13) (ATCC, CCL-10). При культивировании вируса ящура на культуре клеток ВНК-21 использована поддерживающая среда, для приготовления которой к питательной среде DMEM добавляли до 2 % фетальной сыворотки КРС, глутамин – 1 %, пенициллин – 100 МЕ/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл и нистатин – 50 Ед/мл.

Инфицирование монослоя культуры клеток ВНК-21. Для инфицирования клеток ВНК-21 в клеточных культуральных фабриках удаляется ростовая среда, вносится 1800 мл поддерживающей среды DMEM и 200 мл биологического материала. Тщательно смешивается и инкубируется при (37±0,5 °С). В ходе культивирования проводится микроскопирование каждые 3 часа. Учет результатов проводят при проявлении выраженного цитопатического эффекта вируса на культуру клеток ВНК-21 и при отсутствии таковых в контрольных культурах.

Определение биологической активности вируса ящура. С каждого разведения инокулировали 4 лунки с клетками ВНК-21, а контрольные неинфицированные клетки инокулировали раствором Хэнкса. Планшет инкубировали при 37 °С в течение 2 дней с фиксацией цитопатических действий (ЦПД) вируса на клетки и сравнивали с контрольными неинфицированными клетками. Титр вируса выражали как log₁₀ TCID₅₀, как описано Reed и Muench [9].

Выделение РНК вирусов. РНК вирусов экстрагировали из вирусосодержащего материала в условиях лаборатории BSL-2 набором QIAamp Viral RNA Mini Kits (50) фирмы Qiagen в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрацию полученных РНК вирусов проверяли на спектрофотометре Nano Drop 2000.

Постановка полимеразной цепной реакции. Для наработки фрагментов кДНК использовали набор «Super Script III One-Step RT-PCR with platinum Taq», фирмы Invitrogen. Амплификацию проводили с использованием термоци-

клера GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems. Для наработки специфических участков вируса ящура, использовали праймеры, указанные в таблице 1 [10].

Амплификацию ПЦР продуктов проводят при следующих температурно-временных режимах: наработка первой цепи кДНК – 45°С 60 минуты, активация полимеразы при 94°С 2 минуты, 31 циклов: 94°С -1 мин, 60°С -45 сек, 68°С – 2 мин, 68°С – 7 мин.

Постановка ОТ-ПЦР в реальном времени. ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на термоциклере Rotor-Gene Q, Qiagen. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени выявляли и анализировали программным обеспечением Rotor-Gene Q версии 1.8.187.5.

Секвенирование методом Сэнгера. Секвенирование 146S компонента вируса ящура после очистки ПЦР продукта проводилась с использованием циклического секвенирования по методу Сэнгера с набором AB BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), с использованием праймеров (таблица 1), которые использовались на этапе наработки. Продукты очищали набором BigDye Xterminator (Thermo Fisher Scientific, США) и секвенировали с помощью генетического анализатора 3130 XL (Applied Biosystems).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы вакцин, используемые в конкретном географическом регионе, в основном зависят от серотипов и генотипов, циркулирующих в регионе. Соответственно, не существует универсальной вакцины для борьбы с ящуром, поскольку в разных географических регионах используются разные вакцинные штаммы. Всемирная справочная лаборатория по ящуру (WRL-FMD) обычно рекомендует вакцинные штаммы для включения в резервы антигенов и в различные региональные пулы. С глобализацией торговли и увеличением миграции людей всегда существует возможность заноса в регион новых штаммов ящура. Поэтому предпочтительны вакцинные штаммы с широким иммунологическим охватом, и важно

Тип	Нуклеотидная последовательность праймера
O, F (ARS4)	ACC AAC CTC CTT GAT GTG GCT
O, R(NK61)	GAC ATG TCC TCC TGC ATC TG

Для наработки ПЦР продуктов использовали следующую реакционную смесь:

Вода	33,5 мкл
10x буфер	5,0 мкл
MgCl ₂	2,0 мкл
дНТФ (10mM each)	1,0 мкл
Праймер прямой	2,5 мкл
Праймер обратный	2,5 мкл
Фермент	0,50 мкл
кДНК вируса	3,0 мкл
Конечный объем	50 мкл

оценить способность вакцинных вирусов вызывать эффективную перекрестную защиту от нескольких циркулирующих штаммов, включая внеконтинентальные изоляты [11]. В настоящее время существует не так много исследований, сообщающих о систематической работе по подбору вакцин с использованием вирусов со всего мира. Кроме того, отчеты, если таковые имеются, не охватывают все серотипы/штаммы, циркулирующие в регионе.

Серотип О вызывает более 60 % вспышек во всем мире [12] и существует в виде 11 генетически различных топотипов, которые далее делятся на разные генотипы.

В настоящее время во всем мире используются три основные вакцины против серотипа О.

1) O/Campos (топотип Euro-SA), отобранный и согласованный для использования в Южной Америке;

2) O/Manisa или O/PanAsia-2 (топотип ME-SA), в основном используемый на Ближнем Востоке, в Азии, включая Юго-Восточную Азию, а также в некоторых странах Африки;

3) O/IND/R2/75 (топотип ME-SA), в основном используется в Индии.

Штамм O/Manisa эффективно использовался в качестве вакцины более пяти десятилетий. Однако в течение последних нескольких лет он не смог защитить от вирусов, циркулирующих на Ближнем Востоке, что привело к разработке вакцины из штамма O/PanAsia-2. Так использование вакцины O/Manisa на Дальнем Востоке (Южная Корея и Япония) не обеспечило оптимальной перекрестной защиты [13], что подчеркивает необходимость поиска новых штаммов для приготовления вакцины против серотипа О в этом регионе.

Недавние исследования с использованием в общей сложности 85 вирусов ящура серотипа О, собранных за 20-летний период с 1993 по 2012 год в Азии показали что штамм O/PanAsia-2 перекрывает более чем 95 % вирусов.

Серотип А очень разнообразен в антигенном отношении и насчитывает более 32 генотипов [14] и меняется быстрее, чем серотип О, о чем свидетельствует появление разных антигенно различных штаммов на Ближнем Востоке и в Южной Америке за последние два-три десятилетия. В последние годы было обнаружено, что вакцины из штамма А22, которые в последние тридцать лет использовались для профилактики не соответствуют большинству вирусов. Также было установлено, что ни одна из вакцин не оказалась хорошо сочетающейся с вирусом А/Иран-05, циркулирующим в регионе. Данный факт указывает на то, что может потребоваться включение состав вакцин нескольких штаммов этого серотипа, или может потребоваться

Таблица 2. Заболеваемость ящуром в 2010-2021 гг.

ваться использование в составе вакцин разных штаммов для разных стран.

Вирусы Asia 1 распространены в основном на азиатском континенте. Их считали антигенно менее разнообразными, и до сих пор в полевых условиях обнаружен только один топотип вируса [15]. В настоящее время доступны вакцины, имеющие в своем составе штаммы Asia-1/Shamir, Asia-1/YNBS/58 и Asia-1/IND 8/79. Штамм Asia-1/Shamir используется по всей Азии, тогда как использование Asia-1/IND и Asia-1/YNBS/58 в основном ограничено Индийским субконтинентом и Китаем соответственно.

Таким образом, тщательное рассмотрение и обоснованное решение, основанное на эпидемиологической информации, включая топотипы и генотипы, циркулирующие в настоящее время в странах, а также регулярные исследования по подбору вакцин имеют решающее значение для успеха программ борьбы с ящуром в регионе.

Выбор вакцин и успешные кампании вакцинации основаны на глубоких знаниях эпидемиологии региона, где будут использоваться эти вакцины. Обычно при разработке противоящурных вакцин в качестве антигенов выбираются самые последние штаммы, циркулирующие в конкретном регионе. С этой целью нами были проведены анализ эпидемиологической ситуации по ящурю за последние годы. Анализ данных показал, что за последние 13 лет на территории Казахстана было зарегистрировано вспышки ящура вызванные 5 разными вирусами ящура (таблица 2). А именно: 11 вспышек были вызваны эндемичным для южных регионов вирусом ящура O/PanAsia-2, 7 вспышек – вирусом O/PanAsia, 2 вспышки – вирусом A/Iran-05, 4 вспышки – вирусом A/SEA-97 топотипа ME-SA и 1 вспышка вирусом O/IND-2001 [16].

Во всех случаях сотрудниками Научно-исследовательского института биологической безопасности (НИИПББ) проводились сбор образцов от больных животных, выделение вируса и изучение их молекулярно-генетических свойств.

Секвенирование и филогенетический анализ полученных данных позволил определить происхождение вирусов, вызвавших эпизоотии в том или ином регионе. На рисунках 1-3 показаны результаты филогенетического анализа вирусов ящур на территории Республики Казахстана (РК).

Также необходимо отметить, что в странах Азии за последние годы отмечены вспышки ящура, вызванные вирусами A/ASIA/G-VII, O/ME-SA/Ind-2001/d, O/ME-SA/Ind-2001/e, O/ME-SA/PanAsia2/ANT-10, O/ME-SA/PanAsia2/

Штаммы вируса ящура	Количество очагов по годам						Всего очагов
	2010	2011	2012	2013	2017	2021	
O/ME-SA/ Pan-Asia-2	1	3	5	-	1	1	11
O/ME-SA / Pan-Asia	-	4	3	-	-	-	7
A/ASIA/Iran-05HER-10	-	-	2	-	-	-	2
A/ASIA/Sea-97	-	-	-	4	-	-	4
O/ME-SA/IND-2001	-	-	-	-	-	1	1
Всего очагов	1	7	10	4	1	2	25

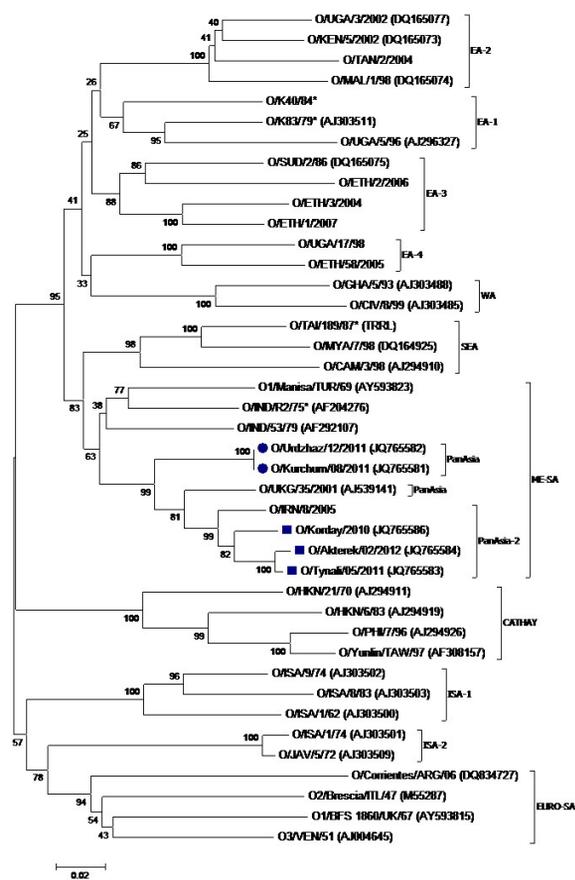


Рисунок 1. Филогенетический анализ вируса ящура типа О, выделенных в РК в 2011-12 гг.

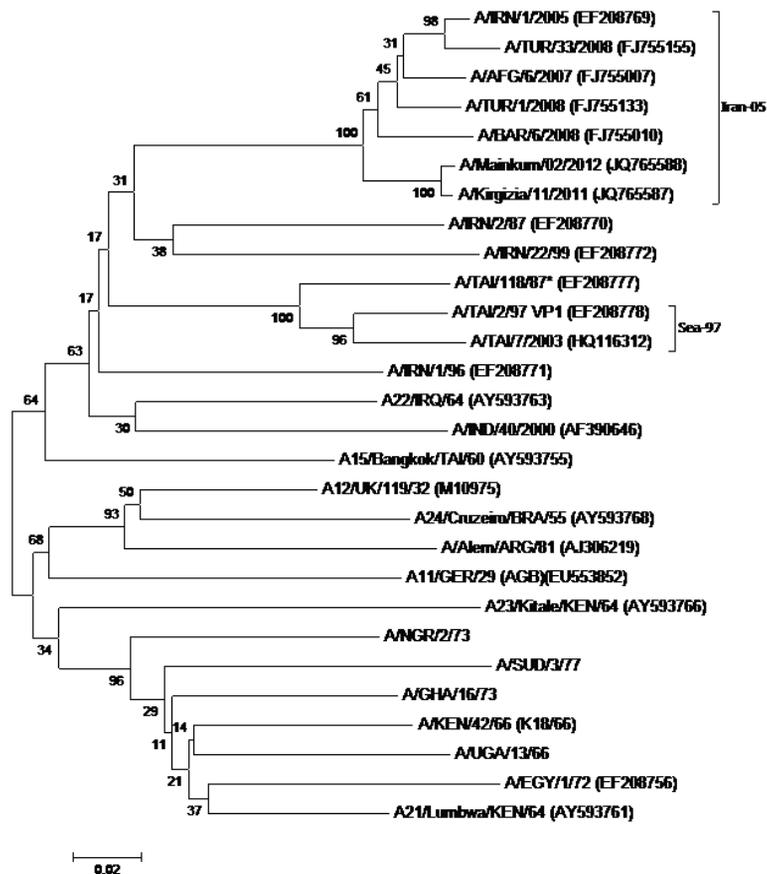


Рисунок 2. Филогенетический анализ вируса ящура типа А, выделенных в РК в 2012 гг.

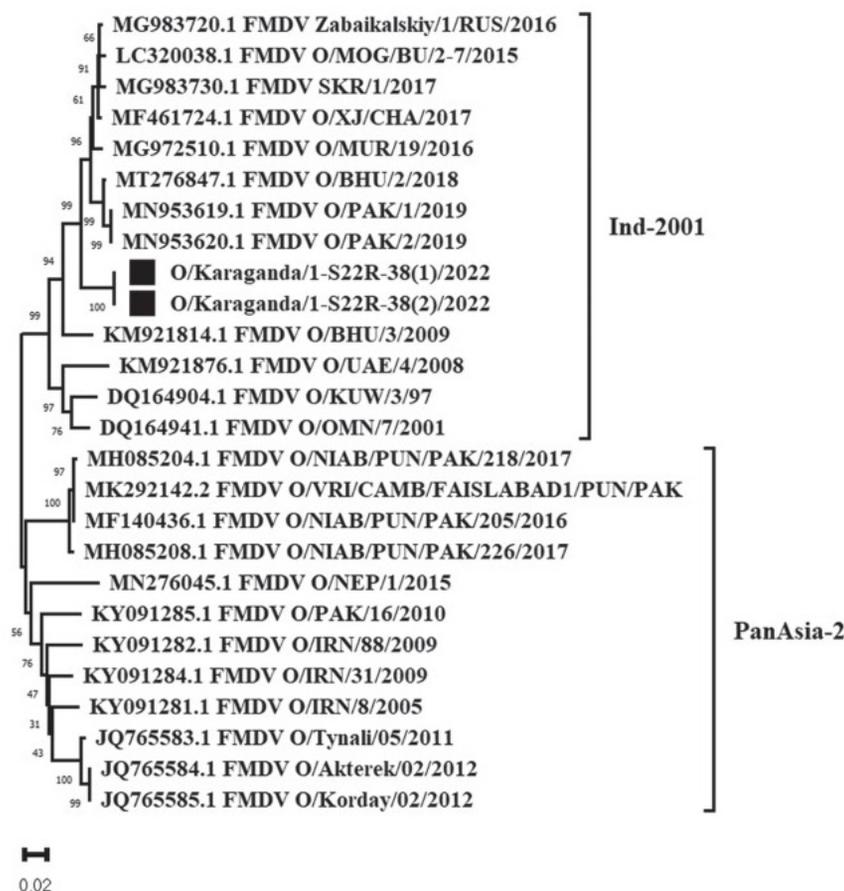


Рисунок 3. Филогенетический анализ вируса ящура типа О, выделенных в РК в 2022 г.

QOM-15, Asia-1/Mya-2017.

Таким образом, обнаружение за последние годы широкого спектра штаммов вируса ящура как на территории нашей страны, так и в сопредельных странах требует тщательного подбора штаммов для включения их в состав производимых вакцин.

На основе анализа литературных данных и эпидемиологической ситуации в Республике Казахстан и сопредельных странах было определено, что для включения в состав вакцины для профилактики ящура в Казахстане можно использовать штаммы вируса ящура О/ME-SA/PanAsia-2, А/Iran-05 и А22, а также штамм Asia-1/Shamir.

На основе анализа результатов исследований, проводимых в Республике Казахстан и сопредельных странах для включения в состав вакцины были выбраны следующие

ише изоляты вируса ящура имеющиеся в коллекции микроорганизмов НИИПББ:

- FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012
- FMD/A/Iran-05/KZ/Moinkum/2014
- FMD/Asia-1/KGZ/10/2007

Изоляты FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012, FMD/A/Iran-05/KZ/Moinkum/2014, FMD/Asia-1/KGZ/10/2007 хранятся в коллекции НИИПББ и были слабо изучены.

С целью паспортизации указанных штаммов были проведены исследования по адаптации вышеперечисленных изолятов в культуре клеток ВНК-21. Культивирование вирусов проводили стационарным способом в культуральных матрасах. А учитывая, что для производства инактивированной вакцины требуется значительное ко-

Таблица 3. Биологическая активность вирусов ящура (X+m, n=3)

Пассажный уровень	Биологическая активность вируса, lg ТЦД _{50/см} ³			Специфичность (ПЦР)		
	А	О	Азия-1	А	О	Азия-1
1	1,5± 0,14	1,83 + 0,08	1,75 + 0,14	+	+	+
2	3,58±0,08	2,75 + 0,14	2,83 + 0,08	+	+	+
3	5,58±0,08	5,5± 0,14	6,5±0,14	+	+	+
4	6,25±0,14	6,5±0,14	6,58±0,08	+	+	+
5	6,25±0,14	6,58±0,08	6,58±0,08	+	+	+
6	6,5±0,14	6,58±0,08	7,25±0,14	+	+	+
7	6,58±0,08	6,58±0,08	7,25±0,14	+	+	+
8	6,58±0,08	7,25±0,14	6,83±0,08	+	+	+
9	6,58±0,08	7,25±0,14	7,25±0,14	+	+	+
10	6,58±0,08	6,75 + 0,14	7,25±0,14	+	+	+

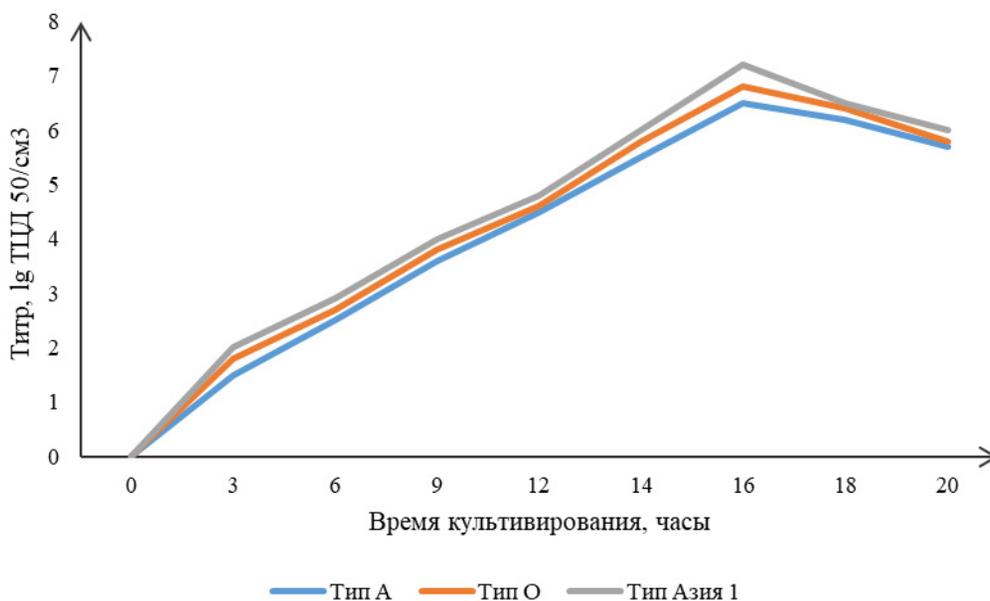


Рисунок 4. Репродуктивная активность и время культивирования штаммов вируса ящура

личество вирусного сырья, разработан метод культивирования вируса в клеточных фабриках Cell Factory Systems (Thermo Scientific), как наиболее технологичные. Для изучения стабильности культуральных свойств было проведено 10 пассажей в культуре клеток ВНК-21 (таблица 3). ЦПД вирусов проявлялось в первом и втором пассажах на 3 сутки, а в последующих пассажах – на 1 сутки культивирования. В указанной культуре на третьем пассажном уровне было отмечено четкое ЦПД на 14-16 часы культивирования с поражением 75-90 % клеточного пласта. Накопление вируса в указанной культуре начиная с четвертого пассажного уровня происходило в титрах от 6,5 до 7,25 lg TCID_{50/cm}³.

Таким образом вирусы ящура FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012, FMD/A/Iran-05/KZ/Moinkum/2014, FMD/Asia-1/KGZ/10/2007 в течение 10 последовательных пассажей в культуре клеток ВНК-21 проявили стабильную инфекционную активность, которая была в пределах 6,5-7,25 lg TCID_{50/cm}³ (рисунок 4).

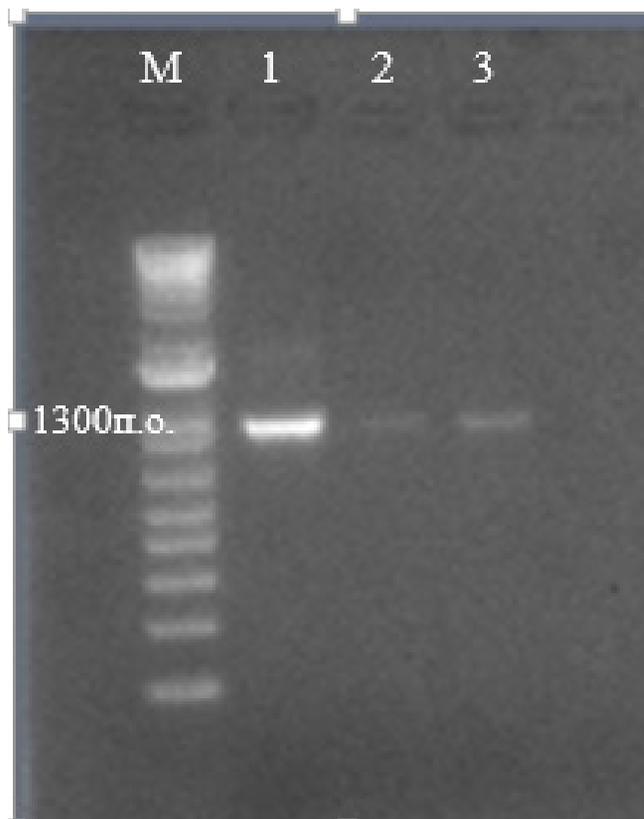
Изучение репродукции вируса в культуре клеток ВНК-21 при разной множественности инфицирования показало, что при инфицировании в дозе 0,1-0,01 TCID_{50/кл} через 14-16 часов активность вируса в суспензии достигала 6,5-7,25 lg TCID_{50/cm}³.

Для проведения молекулярно-генетических исследований вируса ящура, была проведена наработка участка VP1 гена с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров ARS4/NK61. Результаты амплификации представлены на рисунке 5.

Электрофоретический анализ на 1% агарозном геле показал, что наработаны ПЦР продукты размером ~1300 п.о., характерные для участка VP1 гена типа О вируса ящура.

ПЦР анализ подтвердил, что исследуемые образцы показывают принадлежность к вирусу ящура типа О накоплением ПЦР продукта участка VP1 гена.

С целью определения происхождения вирусов было проведено секвенирование и анализ аминокислотный



М- 1 kb маркер, Invitrogen; 1 - контроль, вирус ящура, тип О; 2 – вирус ящура; 3 – вирус ящура;

Рисунок 5. Электрофореграмма ПЦР продуктов вируса ящура

и нуклеотидной последовательности участка VP-1 гена вирусов ящура типа О. Секвенирование ПЦР продукта участка VP1 гена типа О вируса ящура провели методом дидеоксисеквенирования по Сенгеру на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3130 xl, Applied Biosystems с использованием набора BigDye Terminator v.3.1.

Аминокислотный анализ VP-1 гена показал, что изолят O/Korday/02/2012 выделенный в Жамбылской обла-

Таблица 4. Анализ аминокислотной и нуклеотидной последовательности VP-1 гена вирусов ящура, выделенных в Западно-Казахстанской, Алматинской и Жамбылской областях.

Генотип	Штамм	Страна	Дата	Идентичность по VP1, %		Основные аминокислотные различия в гене VP1							Генбанк
				nt	aa	24	134	140	143	144	158	194	
PanAsia-2	O/IRN/8/2005	Iran	2005	ref	ref	V	S	P	N	V	T	I	KR149716
	O/Kordai/02/2012	Kaz	2012	94,4	97,6	T	C	H	N	V	A	V	JQ765585

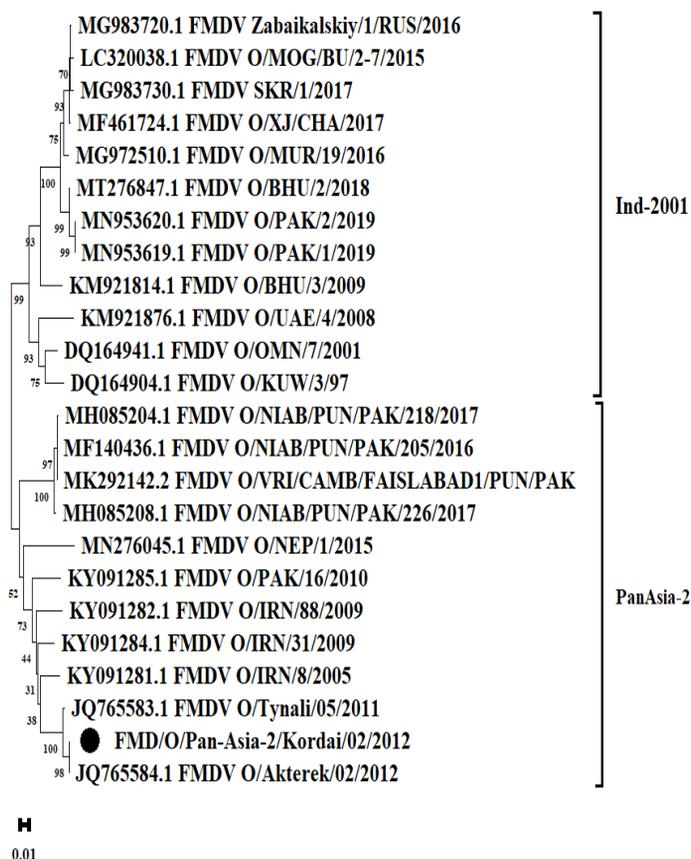


Рисунок 6. Дендрогамма нуклеотидных последовательностей VP1 вируса ящура, типа О (FMD/O/Pan-Asia-2/Kordai/02/2012)

сти имеет 97,6% идентичность с референтным штаммом O/IRN/8/2005 относящийся к типу О, топотипу ME-SA, генетической линии Pan-Asia-2 (таблица 4, рисунок 6). Анализ нуклеотидной последовательности показал, что изолят, выделенный в Жамбылской области в 2012 г., на 94,4% идентичен эталонному штамму.

При секвенировании ПЦР продукта, получена нуклеотидная последовательность характерная для вируса ящура, типа О.

На основе полученных данных было построено филогенетическое дерево (рисунок 6).

Выделенный штамм условно обозначен FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012, паспортизирован и депонирован в коллекции НИИПББ под регистрационным номером М-09-23/D. В ходе проведения филогенетического анализа штамм FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012 был отнесен к линии PanAsia-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований установлено, что максимальное накопление вируса в культуре клеток ВНК-21 происходит при множественности заражения 0,01-0,1 ТЦД_{50/ккл} и инкубировании при 37 °С в течение 16 часов. Соблюдение указанных параметров обеспечивает получение вируса с биологической активностью до (6,58±0,14) lg ТЦД_{50/см}³.

В результате проведенных исследований определены технологические параметры культивирования вирусов ящура FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012, FMD/A/Iran-05/KZ/Moinkum/2014 и FMD/Asia-1/KGZ/10/2007.

Секвенирование и филогенетический анализ подтвердил специфичность штаммов.

Штамм FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012 паспортизирован и депонирован в коллекции НИИПББ под регистрационным номером М-09-23/D. На штаммы FMD/A/

Iran-05/KZ/Moinkum/2014 и FMD/Asia-1/KGZ/10/2007 составлены паспорта, проведена наработка вирусов для депонирования в коллекции микроорганизмов НИИПББ.

Резюмируя вышеизложенное, данные штаммы FMD/O/PanAsia-2/Kordai/02/2012, FMD/A/Iran-05/KZ/Moinkum/2014 и FMD/Asia-1/KGZ/10/2007 вполне могут быть использованы для изготовления отечественной трехвалентной вакцины против ящура типа А, О и Азия-1.

БЛАГОДАРНОСТЬ, КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы публикации выражают благодарность руководителю и всем исполнителям, вовлеченных в разрешении научного проекта за 2024 год на тему «Разработка технологии изготовления поливалентной вакцины против ящура типов А, О, Азия-1».

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлено за счет НТП «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным инфекциям».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов к опубликованной материалам в статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jamal S. M., Belsham G. J. Foot-and-mouth disease: past, present and future // *Vet. Res.* – 2013. – Vol. 44(1). – P. 116.

2. Keet D. F., Hunter P., Bengis R. G., Bastos A., Thomson G. R. The 1992 foot-and-mouth disease epizootic in the Kruger National Park // *J. S. Afr. Vet. Assoc.* – 1996 – Vol. 67(2). – P. 83–7.

3. Perl S., Hyadin H., Yakobson B., Zuckerman E., Orgad U. // Pathological changes in mountain gazelles challenged with FMD virus, with special reference to pancreatic lesions. *Rev. Sci Tech.* – 1989 – Vol. 8(3). – P. 765–9. Epub 1989/01/01. <https://doi.org/10.20506/rst.8.3.424> PMID: 32344950

4. Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. I., Garland A. M. // The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* – 2003 – Vol. 129(1). – P.1–36. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(03)00041-0) PMID: 12859905

5. Arzt J., Juleff N., Zhang Z., Rodriguez L. L. // The pathogenesis of foot-and-mouth disease I: viral pathways in cattle. *Transbound Emerg Dis.* – 2011 – Vol. 58(4). – P. 291–304. Epub 2011/03/04. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01204.x> PMID: 21366894.

6. WOA – Foot-and-mouth-disease. URL: <https://www.woah.org/en/disease/foot-and-mouth-disease/>.

7. OIE/FAO Reference Laboratory Network for Foot-and-Mouth Disease. <https://www.foot-and-mouth.org>.

8. Ingrid E. Bergmann, Viviana Malirat, Andrea Pedemonte & Eduardo Maradei // Challenges in foot-and-mouth disease virus strain selection as an input to attain broad vaccine intraserotype cross-protection / *Expert Review of*

Vaccines. – 2021 – Vol. 20(1). – P. 13–22.

9. Reed, L. J. and Muench, H. // A simple method of estimating 50 % end points. / *Am. J. Hyg.* – 1938 – Vol. 27. – P. 493–497.

10. Knowles N. J. & Samuel A. R. // «RT-PCR and Sequencing Protocols for the Molecular Epidemiology of Exotic Virus Diseases of Animals» Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 0NF, United Kingdom – 1998.

11. Galdo Novo, S., Malirat V., Maradei E. D., et al. // Antigenic and immunogenic spectrum of foot-and-mouth disease vaccine strain O1 Campos against representative viruses of topotypes that circulated in Asia over the past decade. *Vaccine.* – 2017 – Vol. 35. – P. 2303–2307

12. Rweyemamu M., Roeder P., Mackay D., et al. // Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide. *Transbound Emerg Dis.* – 2008 – Vol. 55. – P.57–72.

13. Mahapatra M., Upadhyaya S., Aviso S. , et al. // Selection of vaccine strains for serotype O foot-and-mouth disease viruses (2007–2012) circulating in Southeast Asia, East Asia and Far East. *Vaccine.* – 2017 – Vol. 35. – P. 7147–7153;

14. Knowles N. J., Samuel A. R. // Molecular epidemiology of foot-and mouth disease virus. *Virus Res.* – 2003. – Vol. 91. – P.65–80.

15. Орынбаев М. Б., Закарья К. Д., Хайруллин Б. М., Керимбаев А. А., Омарова З. Д., Копеев С. К., Строчков В. М., Султанкулова К. Т. // Молекулярная эпидемиология ящура в Республике Казахстан в 2011–2013 годы. *Биобезопасность и биотехнология.* – 2021. – № 6. – С. 19–30.

16. Наханов А. К., Абеуов Х. Б., Омарова З. Д., Ермакбай Т. Т., Бурашев Е. Д., Орынбаев М. Б. // Первый случай ящура O/ME-SA/IND-2001 в Казахстане. *Журн. Проблемы особо опасных инфекций.* – 2023 – № 2. – С. 140–145. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-2-140-145>.

REFERENCES

1. Jamal S. M., Belsham G. J. Foot-and-mouth disease: past, present and future // *Vet. Res.* – 2013. – Vol. 44(1). – P.116.

2. Keet D. F., Hunter P., Bengis R. G., Bastos A., Thomson G. R. The 1992 foot-and-mouth disease epizootic in the Kruger National Park // *J. S. Afr. Vet. Assoc.* – 1996 – Vol. 67(2). – P.83–7.

3. Perl S., Hyadin H., Yakobson B., Zuckerman E., Orgad U. // Pathological changes in mountain gazelles challenged with FMD virus, with special reference to pancreatic lesions. *Rev. Sci Tech.* – 1989 – Vol. 8(3). – P.765–9. Epub 1989/01/01. <https://doi.org/10.20506/rst.8.3.424> PMID: 32344950

4. Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. I., Garland A. M. // The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* – 2003 – Vol. 129(1). – P.1–36. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(03)00041-0) PMID: 12859905

5. Arzt J., Juleff N., Zhang Z., Rodriguez L. L. // The pathogenesis of foot-and-mouth disease I: viral pathways in

cattle. *Transbound Emerg Dis.* – 2011 – Vol. 58(4). – P.291–304. Epub 2011/03/04. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01204.x> PMID: 21366894.

6. WOAHP – Foot-and-mouth-disease. <https://www.woah.org/en/disease/foot-and-mouth-disease/>.

7. OIE/FAO Reference Laboratory Network for Foot-and-Mouth Disease. <https://www.foot-and-mouth.org>.

8. Ingrid E. Bergmann, Viviana Malirat, Andrea Pedemonte & Eduardo Maradei // Challenges in foot-and-mouth disease virus strain selection as an input to attain broad vaccine intraserotype cross-protection / Expert Review of Vaccines. – 2021 – Vol. 20(1). – P. 13–22.

9. Reed, L. J. and Muench, H. //A simple method of estimating 50 % end points. / *Am. J. Hyg.* – 1938 – Vol. 27. – P. 493–497.

10. Knowles N. J. & Samuel A. R. // «RT-PCR and Sequencing Protocols for the Molecular Epidemiology of Exotic Virus Diseases of Animals» Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 0NF, United Kingdom – 1998.

11. Galdo Novo, S, Malirat V., Maradei E. D., et al. // Antigenic and immunogenic spectrum of foot-and-mouth disease vaccine strain O1 Campos against representative viruses of topotypes that circulated in Asia over the past decade. *Vaccine.* – 2017 – Vol. 35. – P. 2303-2307

12. Rweyemamu M., Roeder P., Mackay D., et al. // Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide. *Transbound Emerg Dis.* – 2008 – Vol. 55. – P.57–72.

13. Mahapatra M., Upadhyaya S., Aviso S., et al. // Selection of vaccine strains for serotype O foot-and-mouth disease viruses (2007–2012) circulating in Southeast Asia, East Asia and Far East. *Vaccine.* – 2017 – Vol. 35. – P. 7147-7153.

14. Knowles N. J, Samuel A. R. //Molecular epidemiology of foot-and mouth disease virus. *Virus Res.* – 2003. – Vol. 91. – P.65–80.

15. Orynbaev M. B., Zakar'ya K. D., Hajrullin B. M., Kerimbaev A. A., Omarova Z. D., Kopeev S. K., Stochkov V. M., Sultankulova K. T. // Molekulyarnaya epidemiologiya yashchura v Respublike Kazahstan v 2011-2013 gody. *Biobezopasnost' i biotekhnologiya.* – 2021 –Vol. 6. – P. 19-30.

16. Nahanov A. K., Abeuov H. B., Omarova Z. D., Ermekbaj T. T., Burashev E. D., Orynbaev M. B. // Pervyj sluchaj yashchura O/ME-SA/IND-2001 v Kazahstane. *Zhurn. Problemy osobo opasnyh infekcij.* – 2023 – Vol. 2. – P. 140-145. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-2-140-145>.

STRAIN SELECTION AND CULTIVATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUSES FOR THE DEVELOPMENT OF A TRIVALENT INACTIVATED VACCINE

Burashev Y.D., Orynbayev M.B., Abeuov K.B., Sultankulova K.T. *, Tulendibayev A.B., Omarova Z.D. , Argimbayeva T.U., Yermekbai T.T., Aubakir N.A.

LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», Gvardeysky settlement, Kordai district, Zhambyl region, 080409

** Correspondence: abeuov_khairulla@mail.ru.*

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease is a well-known transboundary animal disease and has been recognised as a priority disease by the Steering Committee of the Global Framework for the Progressive Control of Transboundary Animal Diseases in Europe.

The territory of the Republic of Kazakhstan is generally free of foot-and-mouth disease, however, sporadic cases of foot-and-mouth disease occur in various regions of the country as a result of importation from unfavorable countries. Epizootic safety in the Republic of Kazakhstan is maintained by vaccinating animals in the border areas of the southern and eastern regions. Inactivated vaccines against serotypes A, O, Asia produced by the All-Russian Research Institute of Animal Health (Russia) are used for vaccination.

Continuous seromonitoring is carried out to maintain the level of post-vaccination antibodies at a high level, ensuring the immunity of animals to foot-and-mouth disease. However, despite all the measures taken, sporadic outbreaks of foot-and-mouth disease cause damage to livestock farming in the Republic of Kazakhstan.

The effectiveness of preventive measures using vaccination depends on the strain used in the vaccine. The closer the strain used in the vaccine is genetically to the viruses circulating in that area, the more effective the preventive measures will be and the research conducted to create the most immunogenic domestic anti-foot-and-mouth disease vaccines have scientific and practical significance.

This article presents the results of the selection of foot-and-mouth disease virus strains previously circulating in the territory of the Republic of Kazakhstan and studies their cultural and biological properties. Studies of the above-mentioned strains on adaptation to a transplantable cell culture line were conducted, the stability of cultural properties was studied over 10 generations and the stability was confirmed by the PCR method. Also, based on the studies, it was found that the maximum accumulation of the virus in cell culture occurs at a multiplicity of infection of 0.01-0.1 TCID_{50/cell}. The reproductive activity of the studied isolates was within 6.5-7.25 lg TCID_{50/cm}³ when cultivated for 16 hours.

Key words: foot-and-mouth disease isolates, sensitive culture system, biological activity of foot-and-mouth disease isolates, cytopathic effect, PCR, epizootic situation.

ҮШВАЛЕНТТЫ ИНАКТИВТЕНДІРІЛГЕН ВАКЦИНАНЫ ӘЗІРЛЕУ ҮШІН АУСЫЛ ВИРУСТАРЫНЫҢ ШТАМДАРЫН ТАҢДАУ ЖӘНЕ ӨСІРУ

Бурашев Е.Д., Орынбаев М.Б., Абеуов Х.Б., Султанкулова К.Т.*, Тулендибаев А.Б., Омарова З.Д., Аргимбаева Т.У., Ермакбай Т.Т., Әубәкір Н.А.

ЖШС «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты», Гвардейский кенті, Қордай ауданы, Жамбыл облысы, 080409

** Корреспондент автор: abeuov_khairulla@mail.ru.*

ТҮЙІН

Аусыл – жануарлардың белгілі трансшекаралық ауруы және Еуропадағы жануарлардың трансшекаралық ауруларын прогрессивті бақылаудың жаһандық шеңберінің Басқарушы комитеті басым ауру деп таныған.

Қазақстан Республикасының аумағы негізінен аусыл ауруынан таза, бірақ қолайсыз елдерден әкелу нәтижесінде аусылдың окшауланған жағдайлары еліміздің әртүрлі аймақтарында орын алады. Қазақстан Республикасындағы эпизоотиялық салауаттылық оңтүстік және шығыс облыстардың шекаралас аймақтарындағы жануарларды вакцинациялау арқылы қамтамасыз етіледі. Вакцинация үшін БЖҚҒЗИ (Ресей) шығарған А, О, Азия серотиптеріне қарсы инактивтелген вакциналар қолданылады.

Жануарлардың аусылға иммунитетін қамтамасыз ете отырып, вакцинациядан кейінгі антиденелердің деңгейін жоғары деңгейде ұстау үшін тұрақты серомониторинг жүргізіледі. Бірақ, қабылданған барлық шараларға қарамастан, аусылдың кездейсоқ ошақтары Қазақстан Республикасының мал шаруашылығына зиянын тигізуде.

Вакцинацияны қолданатын профилактикалық шаралардың тиімділігі вакцинада қолданылатын штаммға байланысты. Вакцинада қолданылатын штамм генетикалық тұрғыдан сол аймақтың айналымындағы вирустарға неғұрлым жақын болса, соғұрлым алдын алу шаралары тиімдірек болады және отандық аусылға қарсы ең иммуногенді вакцина препараттарын әзірлеу бойынша жүргізіліп жатқан зерттеулердің ғылыми және практикалық маңызы бар.

Бұл мақалада бұрын Қазақстан Республикасының аумағында тараған аусыл вирусының штамдарын іріктеу нәтижелері берілген және олардың жасушалық-биологиялық қасиеттері зерттелінді. Дамылсыз өсетін жасуша өсіндерінің желілеріне бейімделу бойынша жоғарыда аталған штамдарға зерттеулер жүргізілді, өсінділік қасиеттердің тұрақтылығы 10 ұрпақ бойына зерттелді және тұрақтылық ПТР арқылы расталды. Сондай-ақ, жүргізілген зерттеулердің негізінде жасуша өсінінде вирустың максималды жинақталуы $0,01-0,1 \text{ TCD}_{50/\text{жасуша}}$ жұқтыруының көптігі кезінде болатыны анықталды. Зерттелетін изоляттардың репродуктивті белсенділігі 16 сағат бойы өсіру кезінде $6,5-7,25 \lg \text{ TCD}_{50/\text{см}^3}$ диапазонында болды.

Негізгі сөздер: аусыл изоляттары, сезімтал өсіру жүйесі, аусыл изоляттарының биологиялық белсенділіктері, цитопатиялық әсер, ПТР, эпизоотиялық жағдай.