МРНТИ 34.33.15; 34.31.19; 68.41.37 DOI: 10.58318/2957-5702-2025-23-4-13
Оригинальная статья

МИКРОНОСИТЕЛИ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO: ПОДХОД К ЭФФЕКТИВНОЙ РЕПЛИКАЦИИ И МАСШТАБИРОВАНИЮ ЧМЖЖ (ШТАММ NIGERIA 75/1)

Саметова Ж.Ж.*, Аманова Ж.Т., Тұрыскелді Ш.С., Үсембай А.Қ., Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А.

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
*zh.sametova@biosafety.kz

Аннотация. В настоящем исследовании оценивалась репродукция штамма *Nigeria* 75/1 вируса чумы мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) в культуре клеток *Vero*, культивируемых в суспензионных условиях с использованием микроносителей (МН). Данный подход представляет собой современную платформу, сочетающую преимущества суспензионного культивирования с высокой удельной продуктивностью клеток, обеспечиваемой адгезией на поверхности МН.

Было исследовано влияние различных параметров – типа МН (Cytodex 1 и Cytodex 3), посевной концентрации клеток *Vero*, инфицирующей дозы вируса и длительности культивирования на продуктивность системы. Экспериментальные результаты показали, что использование МН обеспечивает надежную адгезию и активную пролиферацию клеток *Vero*, создавая оптимальные условия для репликации вируса. Полученный вирусный титр (≥ 6,75 lg $ТЦД_{50}$/см³) превышал показатели, описанные при традиционном монослойном культивировании, что свидетельствует о повышенной эффективности репродукции вируса. Таким образом, полученные данные подтверждают высокую перспективность технологии культивирования с применением МН как в экспериментальных исследованиях, так и для промышленной разработки и производства вакцин против ЧМЖЖ.

Ключевые слова: вирус, чума мелких жвачных животных, культура клеток Vero, суспензионное культивирование, микроносители.

Введение

Чума мелких жвачных животных (*Peste des petits ruminants,* ЧМЖЖ) – высококонтагиозное вирусное заболевание, вызываемое вирусом ЧМЖЖ, относящимся к роду *Morbillivirus* семейства *Paramyxoviridae* [1]. Возбудитель поражает овец, коз и других мелких жвачных животных, вызывая высокую смертность и значительные экономические потери, особенно в странах Африки, Ближнего Востока и Азии [2]. Впервые заболевание было описано в 1942 г в Кот-д'Ивуаре, и в настоящее время о случаях ЧМЖЖ регулярно сообщается в странах указанных регионов [3]. Согласно данным МЭБ, из 198 стран, признанных ООН, 57 имеют официальный статус свободных от ЧМЖЖ, 67 остаются эндемичными, а 74 никогда не регистрировали данную инфекцию. По оценкам ФАО (2018 г.), около 68% мирового поголовья мелких жвачных (примерно 2,5 млрд голов) сосредоточено в инфицированных странах, что напрямую затрагивает более 300 млн семей, чья экономика зависит от овцеводства и козоводства.

Профилактика ЧМЖЖ осуществляется с использованием живых аттенуированных вакцин, разработанных несколько десятилетий назад. Наиболее широко применяются штаммы *Nigeria 75/1 и Sungri 96*, доказавшие высокую эффективность и безопасность при массовой иммунизации в эндемичных регионах [4, 5]. Традиционно вирус для производства вакцин культивируется в адгезивных монослойных культурах клеток *Vero.* Однако этот метод ограничивает масштабируемость, усложняет автоматизацию и требует значительных производственных площадей [4, 6]. В связи с этим возрастает интерес к суспензионным системам культивирования, в частности, с использованием клеток *Vero,* культивируемых на МН [5]. Применение МН позволяет увеличить выход вирусного продукта, повысить стандартизацию технологического процесса и снизить себестоимость производства [7].

Концепция использования МН была предложена Ван Везелем в 1967 году [8] для устранения ограничений традиционных адгезивных культур. МН представляют собой микросферы диаметром

90–350 мкм, на поверхности которых клетки прикрепляются и пролиферируют [9, 10]. Их высокая площадь поверхности способствует увеличению плотности клеточной массы и, соответственно, повышению выхода целевого продукта [11]. Эффективность применения МН зависит от их химических и физико-механических свойств, условий посева и прикрепления клеток, а также методов обработки и отделения клеток от носителя [12]. Важным преимуществом суспензионного культивирования является возможность поддержания стабильных параметров среды (pH, концентрации растворённого кислорода, содержания питательных веществ и метаболитов) на протяжении всего процесса [13]. В настоящее время доступно множество типов МН, включая Cytodex-1, Cytodex-2, Cytodex-3, Hillex, Cytoline-1, Cytoline-2, RapidCell, 2D MicroHex, Synthemax II, SphereCol, Collagen, Cultispher-G, Cultispher-S и др. Комплексный сравнительный анализ около 50 видов МН с различным составом и свойствами был проведён исследовательской группой Derakhti с соавт. [14].

В связи с этим целью настоящей работы является оценка репродукции штамма *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в суспензионной культуре клеток *Vero,* выращенной с использованием МН. Полученные результаты позволят определить потенциал данной платформы для масштабного производства вакцин против ЧМЖЖ.

Материалы и методы

2.1. Культура клеток и вирус. В эксперименте использовали аттенуированный штамм *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ, хранящийся в лаборатории «Коллекции микроорганизмов» Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ). Биологическая активность вируса составляла 5,75 ± 0,4 lg $ТЦД_{50}/см^3$. Для репродукции вируса применяли суспензионные культуры клеток линии *Vero,* полученные от лаборатории «Клеточной биотехнологии», НИИПББ, адаптированные к росту на носителях. В качестве носителей использовали МН типов Cytodex 1 и Cytodex 3 (#GE17-0448-03 и #GE17-0485-01, Cytiva, USA). Перед использованием МН подготовлены в соответствии с инструкцией производителя: промывали, гидратировали в PBS и стерилизовали автоклавированием.

Клетки линии *Vero* культивировали в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA) содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), L-глутамин (#25030081, Gibco, USA), пенициллин и стрептомицин.

2.2. Определение посевной концентрации клеток Vero. Культивирование клеток *Vero* на МН проводили в суспензионных условиях с использованием магнитных мешалок (Bibby Scientific, UK) при 37 ℃ в течение 96 ч. Перемешивание осуществлялось со скоростью 50 об/мин. При культивировании клеток *Vero* на выбранных МН использовали следующие посевные концентраций клеток: 25×10^5 кл/$см^3$; 30×10^5 кл/ $см^3$ и 50×10^5 кл/$см^3$. В качестве ростовой среды использовали DMEM с добавлением 5% FBS и 6% глутамина (в конечной концентрации 1%). Осаждение клеток на поверхности МН осуществляли при 37 ºС в течение 1 ч в режиме периодического перемешивания (5 мин перемешивание, 10 мин покоя), после чего переходили на постоянное перемешивание при 50 об/мин. Заполнение поверхности МН клетками контролировали ежедневным микроскопированием проб клеточной суспензии. Выход клеточной биомассы оценивали через 24, 48 и 96 ч культивирования с использованием автоматизированного счётчика клеток TC20 (Bio-Rad, California, USA).

2.3. Определение инфицирующей дозы вируса. При достижении концентрации клеток не менее $1,5\text{-}3,0 \times 10^5$ кл/мл осуществляли инфицирование клеточной суспензии штаммом *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в дозах 0,1; 0,01; 0,001 $ТЦД_{50}$/кл. Всего были инфицированы 3 спиннера рабочим объемом 500 $см^3$. Инфицированные клетки поместили в инкубатор при 37 ℃ с 5% CO_2 в течение 1 ч с периодическим перемешиванием каждые 10 мин для прикрепления клеток к микроносителям. Культивирование вируса ЧМЖЖ проводили в CO_2-инкубаторе при температуре 37 ℃ с 5% CO_2 в течение 120 ч, с заменой питательной среды через 48 ч, после чего собирали супернатант.

2.4. Определение срока культивирование вируса ЧМЖЖ на МН.

Для определения оптимального срока культивирования проводили инфицирование суспензии клеток Vero с концентрацией не менее 30×10^5 кл/мл в трёх спиннерах рабочим объёмом 500 $см^3$ при дозе 0,01 $ТЦД_{50}$/клетку. Инфицированные клетки поместили в инкубатор при 37 ℃ с 5% CO_2 в течение 120 ч, с заменой питательной среды через 48 ч. Супернатант собирали каждые

2.5. Определение инфекционной активности вируса ЧМЖЖ

Инфекционную активность вирусных образцов определяли методом титрования в клеточной

линии Vero. Для этого клетки высевали в 96-луночные планшеты (10 000 кл./лунка), на следующий день вносили десятикратные серийные разведения вирусных образцов (10^{-1}–10^{-7}), заражая по 4 лунки на каждое разведение. Инкубацию проводили в CO_2-инкубаторе при (37 ± 0,5) °C в атмосфере 5% CO_2 в течение 10 сут. Цитопатический эффект учитывали с помощью светового микроскопа. Инфекционный титр выражали в lg $TCID_{50}$/мл, рассчитывая его по методу Рида–Менча [15].

2.6. Статистический анализ данных

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.0.1. Сравнение плотности клеток и титров вируса ЧМЖЖ, выращенного на различных типах микроносителей, выполнялось с использованием двухвыборочного t-теста Стьюдента (двусторонний). Статистическую значимость определяли при уровне $p < 0,05$.

Результаты

3.1. Влияние посевной концентрации на ростовые характеристики клеток Vero.

Ростовые параметры клеток *Vero* исследовали при использовании двух типов МН – Cytodex 1 и Cytodex 3. Оценку выхода клеточной биомассы проводили на 24, 48 и 96 ч культивирования. Для отделения клеток от поверхности МН применяли обработку 2 М раствором NaCl с последующим подсчётом. В ходе эксперимента было установлено, что уже через 10–12 ч после посева клетки начинали прикрепляться к поверхности МН и приобретали характерную распластанную морфологию. К 24–30 ч наблюдалось формирование практически сплошного клеточного слоя, покрывающего 90–95% поверхности как Cytodex 1, так и Cytodex 3 (рис. 1).

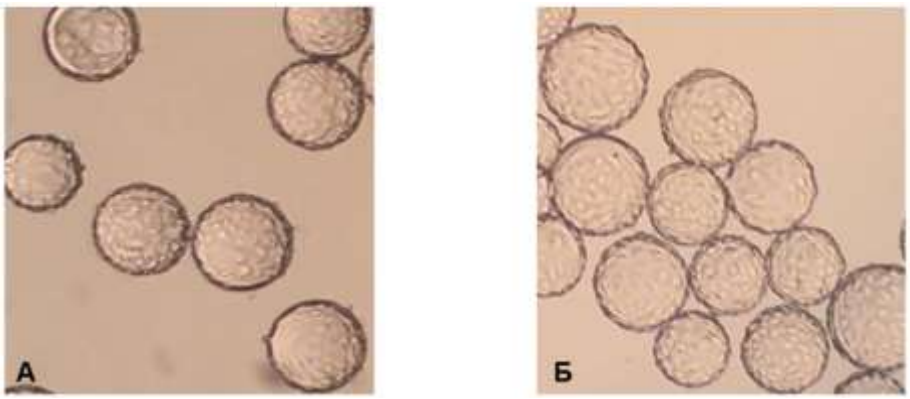


Рисунок 1. Культура клеток линии *Vero*, выращенная на МН: **А.** Cytodex 1. **Б.** Cytodex 3.

Эти результаты подтверждают высокую адгезивную способность клеток линии *Vero* к обоим типам МН и указывает на быстрое формирование плотного клеточного монослоя, что является ключевым условием для эффективной последующей репродукции вируса.

Далее было проведено исследование влияния посевной концентрации клеток *Vero* на их конечное количество при культивировании на различных типах МН (рис. 2). Анализ полученных данных показал, что варьирование исходной плотности клеток оказывало существенное влияние на динамику их роста и накопления биомассы. При низкой концентрации (25×10^5 кл/см^3) прирост клеточной массы был умеренным для обоих типов МН. Повышение посевной концентрации до 30×10^5 кл/см^3 обеспечивало максимальные показатели накопления клеток, особенно на Cytodex 3, где наблюдался наибольший выраженный прирост по сравнению с другими условиями. В то же время при высокой концентрации (50×10^5 кл/см^3) рост клеток замедлялся и конечное их количество снижалось независимо от типа МН. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существовании оптимальной посевной плотности, при которой достигается наиболее эффективный рост клеток *Vero* при культивировании на МН.

Сравнительный анализ роста клеток Vero на микроносителях Cytodex 1 и Cytodex 3 при различных посевных плотностях показал, что среднее количество клеток на Cytodex 3 было выше во всех исследованных условиях по сравнению с Cytodex 1 (рис. 2). Однако статистически значимые различия наблюдались только при посевной плотности $3,0 \times 10^5$ кл/мл (1543,3 ± 245,8 против 895,7 ± 296,8; $p = 0,044$). При плотностях $2,5 \times 10^5$ и $5,0 \times 10^5$ кл/мл различия между группами не достигали уровня статистической значимости ($p = 0,180$ и $p = 0,232$ соответственно). Эти данные указывают на преимущество использования микроносителей Cytodex 3 для

культивирования клеток Vero при оптимальной посевной плотности 3,0 × 10^5 кл/мл.

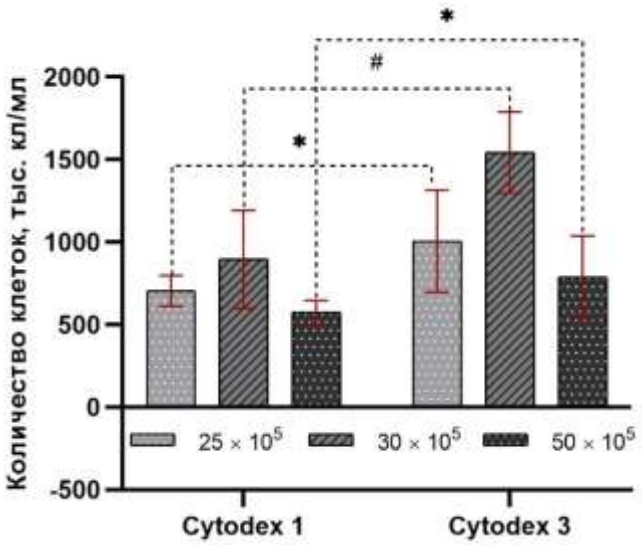


Рисунок 2. Рост клеток линии *Vero* на МН Cytodex 1 и Cytodex 3 в зависимости от посевной концентрации. * p > 0,05, # *p* = 0,044

3.2. Влияние инфицирующей дозы на репликацию вируса ЧМЖЖ

Поскольку инфицирующая доза вируса является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность его накопления, на следующем этапе было изучено влияние дозы заражения на репродукцию вируса в культуре клеток *Vero*, выращенных на МН Cytodex 3 (рисунок 3). Анализ показал, что при инфицирующих дозах 0,1 и 0,01 $ТЦД_{50}$/кл формировались высокие вирусные титры, достигающие до 6,16 и 6,58 lg $ТЦД_{50}/см^3$ соотвтетственно. Наиболее выраженный эффект наблюдался при использовании МН Cytodex 3 с дозой 0,01 $ТЦД_{50}$/кл, где титр составил 6,58 lg $ТЦД_{50}/см^3$, что превышало значения, полученные при применении Cytodex 1. При снижении инфицирующей дозы до 0,001 $ТЦД_{50}$/кл наблюдалось существенное уменьшение титров (до 3,50 - 4,50 lg $ТЦД_{50}/см^3$) вне зависимости от типа МН, что указывает на прямую зависимость эффективности вирусной репликации от величины начальной дозы заражения.

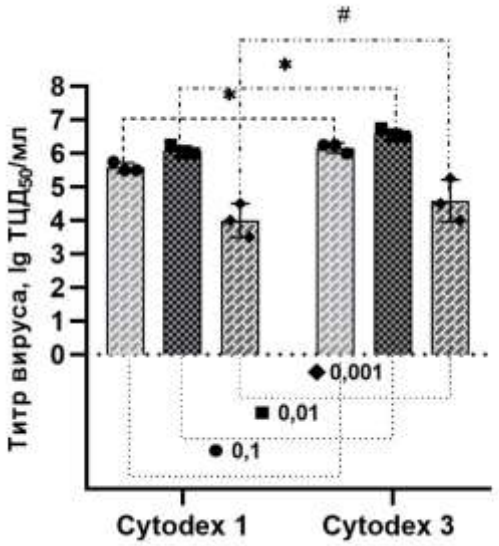


Рисунок 3. Накопление вируса ЧМЖЖ в клетках линии *Vero*, культивируемых на МН Cytodex 1 и Cytodex 3, в зависимости от инфицирующей дозы. * p < 0,05, # p > 0,05

При сравнении титров вируса, полученных на клетках с использованием микронносителей Cytodex 1 и Cytodex 3, были выявлены статистически значимые различия при дозах заражения 0,1 и 0,01 $ТЦД_{50}/см^3$. Так, при дозе 0,1 $ТЦД_{50}/см^3$ средний титр вируса на Cytodex 1 составил 5,58 ± 0,14 log_{10}, тогда как на Cytodex 3 он был достоверно выше — 6,17 ± 0,14 log_{10} (p < 0,05). Аналогичная тенденция отмечена при дозе 0,01 $ТЦД_{50}/см^3$: 6,08 ± 0,14 log_{10} для Cytodex 1 против 6,58 ± 0,14 log_{10}

для Cytodex 3 ($p < 0,05$) (рис. 3).

При наименьшей дозе заражения 0,001 $ТЦД_{50}/см^3$ различия между группами были менее выраженными: 4,00 ± 0,50 log_{10} для Cytodex 1 и 4,58 ± 0,63 log_{10} для Cytodex 3; статистическая значимость различий в этом случае не достигнута ($p > 0,05$) (рис. 3).

Таким образом, наиболее оптимальной дозой инфицирования в данных условиях являлась 0,01 $ТЦД_{50}$/клетку.

3.3. Влияние срока культивирование на репликацию вируса ЧМЖЖ

На основе полученных ранее результатов по оценке посевной концентрации клеток и инфицирующей дозы вируса в качестве оптимального МН был выбран Cytodex 3. С учётом определенных оптимальных параметров (плотность клеток (30×10^5) и доза заражения (0,01 $ТЦД_{50}/см^3$)) проведены дальнейшие исследования, направленные на изучение влияния сроков культивирования на биологическую активность штамма *Nigeria 75/1*. Анализ полученных результатов показал, что инфекционный титр вируса возрастал в течение первых 3-х сут, достигая максимального значения 6,75 ± 0,00 lg $ТЦД_{50}/см^3$ на 3-4 сут (рисунок 4). В дальнейшем наблюдалось постепенное снижение титра, которое к 7-8 сут стабилизировался на уровне около 5,00 lg $ТЦД_{50}/см^3$, а к 9-10 сут снижался до 3,75 ± 0,00 lg $ТЦД_{50}/см^3$. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что оптимальным сроком сбора вируссодержащего материала в данных условиях культивирования являются 3-4 сут после заражения.

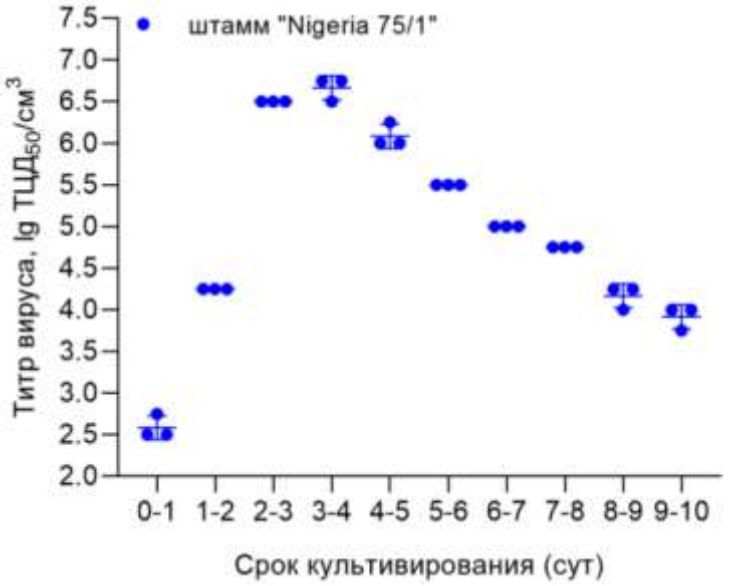


Рисунок 4. Динамика накопления вируса ЧМЖЖ в клетках линии *Vero*, культивируемых на МН Cytodex 3, в зависимости от длительности культивирования

Обсуждение

После первого выявления вируса ЧМЖЖ для обеспечения перекрёстной защиты применялись вакцины против чумы крупного рогатого скота (ЧКРС). Такой подход был обусловлен отсутствием специализированных вакцин против ЧМЖЖ, при этом вирус ЧКРС является филогенетически близким патогеном [16], что позволяло рассчитывать на частичную иммунную защиту. Лишь в 1989 году была внедрена живая аттенуированная вакцина против ЧМЖЖ – штамм *Nigeria 75/1,* после чего использование вакцин против ЧКРС для профилактики ЧМЖЖ было запрещено [17]. Это стало важным этапом формирования самостоятельной стратегии борьбы с заболеванием. В настоящее время живая аттенуированная вакцина *Nigeria 75/1* (линии II) производится в крупных масштабах и применяется в странах Африки, Ближнего Востока и Азии [17–20], что свидетельствует о ее признании как глобального инструмента контроля инфекции. Широкий географический охват применения подтверждает универсальность данного штамма и его высокую эпидемиологическую значимость.

Эффективные живые аттенуированные вакцины против ЧМЖЖ формируют у овец и коз пожизненный защитный иммунитет, обеспечивая перекрёстную защиту от всех четырёх линий вируса [21, 22]. Это делает их одним из наиболее надежных средств профилактики заболевания в эндемичных регионах. Однако при разработке и производстве вакцин необходимо учитывать все

аспекты процесса культивирования и масштабирования. Вакцинное производство требует строгой технологической преемственности между лабораторными и промышленными этапами [23]. Нередко условия, обеспечивающие высокие показатели биологической активности и качества вакцины в малых объёмах при стационарном культивировании, оказываются недостаточно эффективными при переходе к промышленным масштабам. В результате на этапе масштабирования может наблюдаться снижение биологической активности и других ключевых характеристик вакцинного препарата, что требует корректировки технологических режимов. Поэтому проведение исследований, направленных на оптимизацию параметров масштабирования и адаптацию технологических процессов, является актуальной задачей для обеспечения стабильного качества и сохранения иммуногенных свойств вакцины при выпуске больших серий.

В данном исследовании изучена репродукция штамма *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в культуре клеток *Vero*, выращиваемых в суспензионных условиях с применением МН. Такой подход позволяет оценить эффективность альтернативных систем культивирования, которые потенциально могут повысить производительность и упростить процесс масштабирования. Результаты показали высокую эффективность репродукции вируса: полученный титр ($\geq$ 6 lg $ТЦД_{50}/см^3$) сопоставим или превышает значения, описанные при традиционном культивировании в монослое [1, 6]. Использование МН обеспечило увеличение удельной плотности клеток и, соответственно, выход вируса без необходимости расширения площади поверхности, что особенно важно в условиях ограниченных производственных мощностей. Это имеет существенное значение для масштабного производства вакцин, где требуется высокая воспроизводимость и компактность процесса [7].

Культивирование клеток в суспензии с применением МН создаёт предпосылки для переноса технологии в управляемые биореакторные системы, что соответствует современным требованиям к производству вирусных вакцин: автоматизация процессов, обеспечение высокого уровня биобезопасности, снижение рисков перекрёстной контаминации. Ранее аналогичные технологии продемонстрировали эффективность при производстве вакцин против кори, бешенства и других вирусов на основе клеток *Vero* [24, 25], что подтверждает возможность адаптации данного подхода для получения вакцин против ЧМЖЖ в промышленных масштабах.

Таким образом, полученные результаты указывают на высокую перспективность использования технологии культивирования с применением МН в системах на основе клеток *Vero*. Этот подход может быть интегрирован в существующие производственные линии и стать основой для разработки более эффективных и технологически устойчивых методов производства вакцин против ЧМЖЖ.

Заключение

Проведённое исследование подтвердило возможность эффективной репродукции аттенуированного штамма *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в суспензионной культуре клеток *Vero* с использованием МН. Полученные результаты показали, что данный подход обеспечивает формирование высоких вирусных титров ($\geq$ 6,75 lg $ТЦД_{50}/см^3$) и выраженный цитопатический эффект, что свидетельствует о его высокой эффективности.

Выявленные параметры культивирования позволяют рассматривать использование МН как перспективное направление для масштабирования процесса и внедрения в промышленное производство вакцин. Полученные данные могут быть положены в основу разработки технологических решений для получения живой аттенуированной вакцины против ЧМЖЖ с сохранением её биологической активности.

Финансирование: Работа была выполнена в рамках ПЦФ «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» на 2021–2023гг.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература

1. Kumar N and al. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants; A Comprehensive ReviewA threat to small ruminants // Viruses 2014, 6(6), 2287-2327; https://doi.org/10.3390/v6062287

2. Banyard A.C., Parida S., Batten C., Oura C. et al. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control // *Journal of General Virology* (2010), 91, P.2885–2897. https://doi.org/10.1099/vir.0.025841-0

3. FAO/OIE. Global Strategy for the Control and Eradication of PPR. 2015. (Available online: https://openknowledge.fao.org/items/3a081556-4053-499c-856b-b087dce7e604) [Дата обращения 15.08.2025]

4. Hodgson SMoffat K, Hill HFlannery JT, Graham SPBaron MD, Darpel KE.2018.Comparison of the Immunogenicities and Cross-Lineage Efficacies of Live Attenuated Peste des Petits Ruminants Virus Vaccines PPRV/Nigeria/75/1 and PPRV/Sungri/96. J Virol92:10.1128/jvi.01471-18. https://doi.org/10.1128/jvi.01471-18

5. Sen A., Saravanan P., Balamurugan V., Rajak K.K., Sudhakar S.B., Bhanuprakash V., Parida S., Singh R.K. Vaccines against peste des petits ruminants virus // *Expert Review of Vaccines.* 2010. Vol. 9. P. 785-796. https://doi.org/10.1586/erv.10.74

6. Sousa M. et al. Process intensification for Peste des Petites Ruminants Virus vaccine production// *Vaccine*. 2019. Vol. 37, № 47. P. 7041–7051. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.009

7. Silva A.C. et al. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petits ruminants vaccine // *Vaccine*. 2008 Vol. 26, № 26. P. 3305–3311. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.077

8. Van Wezel A. Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture // *Nature.* 1967. Vol. 216. P. 64-65. https://doi.org/10.1038/216064a0

9. GE Healthcare. Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods. 2005. (Available online: https://ru.scribd.com/document/364986081/Microcarrier-Cell-Culture-Principles-and-Methods) [Дата обращения 15.08.2025]

10. Souza, M.C., Freire, M.S., Castilho, L.R. (2007). Cultivation of Vero Cells on Microporous and Macroporous Microcarriers. In: Smith, R. (eds) Cell Technology for Cell Products., vol 3. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5476-1_136

11. Kehoe D., Jing D., Lock L., Tzanakakis E. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells // Tissue Engineering Part A. 2010. Vol.16. – P. 405-421. https://doi.org/10.1089/ten. tea.2009.0454

12. Forestell S., Kalogerakis N., Behie L., Gerson D. Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures // *Biotechnology and Bioengineering*. 2002. Vol.39. – P. 305-313. https://doi.org/10.1002/bit.260390308

13. Caron M., Emans P., Coolsen M., Voss L., Surtel D., Cremers A., van Rhijn L. Welting Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures // *Osteoarthritis and Cartilage.* 2012. Vol. 20. P. 1170-1178. https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016

14. Derakhti S., Safiabadi-Tali S.H., Amoabediny G., Sheikhpour M. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review // *Materials Science and Engineering C*. 2019. Vol. 103. P. 109782. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109782.

15. Reed L.J., Muench H., A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Epidemiology*. 1938. Vol.27, Issue 3, P. 493–497, https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

16. Dou Y., Liang Z., Prajapati M., Zhang R., Li Y., Zhang Z. Expanding diversity of susceptible hosts in Peste Des Petits Ruminants virus infection and its potential mechanism beyond // *Frontiers in Veterinary Sciences*. 2020. Vol. 7. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00066

17. Diallo A, Taylor WP, Lefèvre PC, Provost A. Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue vivant [Attenuation of a strain of rinderpest virus: potential homologous live vaccine]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1989;42(3):311-319.

18. Bora M., Yousuf R.W., Dhar P., Singh R.P. An overview of process intensification and thermo stabilization for upscaling of Peste des petits ruminants vaccines in view of global control and eradication // *Virus disease.* 2018. Vol. 29. P. 285–296. https://doi.org/10.1007/s13337-018-0455-3

19. Sarkar J., Sreenivasa B.P., Singh R.P., Dhar P., Bandyopadhyay S.K. Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine // *Vaccine*. 2003. Vol. 21. P. 4728–4735. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00512-7

20. Diallo A., Minet C., Le Goff C., Berhe G., Albina E., Libeau G., Barrett T. The threat of peste des petits ruminants: Progress in vaccine development for disease control // *Vaccine*. 2007. Vol. 25. P. 5591–5597. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.013

21. Mahapatra M., Selvaraj M., Parida S. Comparison of Immunogenicity and Protective Efficacy of PPR Live Attenuated Vaccines (Nigeria 75/1 and Sungri 96) Administered by Intranasal and Subcutaneous Routes // *Vaccines*. 2020. Vol. 8. P. 168. https://doi.org/10.3390/vaccines8020168

22. Cosseddu G.M., Polci A., Pinoni C., Capobianco Dondona A., Iapaolo F., Orsini G., Izzo F., Bortone G., Ronchi F.G., Di Ventura M., et al. Evaluation of Humoral Response and Protective Efficacy of an Inactivated Vaccine Against Peste des Petits Ruminants Virus in Goats // *Transboundary and Emerging Diseases.* 2016. Vol. 63. P. 447–452. https://doi.org/10.1111/tbed.12314

23. Panagopoulos A., Sideri K. From lab to mass production: a policy for enabling the licensing of mRNA vaccines // Frontiers in Public Health. 2023. Vol. 11. P. 1151713. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1151713

24. Gallo-Ramirez L.E. et al. Production of viral vaccines in suspension cultures of Vero cells using microcarriers: Advances and challenges // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 99. P. 2125–2136.

25. Barrett P.N. et al. Vero cell platform in vaccine production: Moving toward cell culture–based viral vaccines // *Expert Review of Vaccines.* 2009. Vol. 8, № (5). P. 607–618. https://doi.org/10.1586/erv.09.19

References

1. Kumar N., et al. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review and a threat to small ruminants. *Viruses*. 2014;6(6):2287–2327. https://doi.org/10.3390/v6062287

2. Banyard A.C., Parida S., Batten C., Oura C., et al. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Journal of General Virology*. 2010;91:2885–2897. https://doi.org/10.1099/vir.0.025841-0

3. FAO, OIE. *Global Strategy for the Control and Eradication of Peste des Petits Ruminants (PPR)*. Rome; 2015. Available online. Accessed August 15, 2025.

4. Hodgson S., Moffat K., Hill H., Flannery J., Graham S., Baron M.D., Darpel K.E. Comparison of the immunogenicities and cross-lineage efficacies of live attenuated Peste des Petits Ruminants virus vaccines Nigeria 75/1 and Sungri 96. *Journal of Virology*. 2018;92:e01471-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01471-18

5. Sen A., Saravanan P., Balamurugan V., Rajak K.K., Sudhakar S.B., Bhanuprakash V., Parida S., Singh R.K. Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Review of Vaccines*. 2010;9:785–796. https://doi.org/10.1586/erv.10.74

6. Sousa M., et al. Process intensification for peste des petits ruminants virus vaccine production. *Vaccine*. 2019;37(47):7041–7051. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.009

7. Silva A.C., et al. Scalable culture systems using different cell lines for the production of peste des petits ruminants vaccine. *Vaccine*. 2008;26(26):3305–3311. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.077

8. Van Wezel A. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature*. 1967;216:64–65. https://doi.org/10.1038/216064a0

9. GE Healthcare. *Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods*. 2005. Available online. Accessed August 15, 2025.

10. Souza M.C., Freire M.S., Castilho L.R. Cultivation of Vero cells on microporous and macroporous microcarriers. In: Smith R., ed. *Cell Technology for Cell Products*. Vol. 3. Dordrecht: Springer; 2007. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5476-1_136

11. Kehoe D.E., Jing D., Lock L.T., Tzanakakis E.S. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16:405–421. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0454

12. Forestell S.P., Kalogerakis N., Behie L.A., Gerson D.F. Development of optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002;39:305–313. https://doi.org/10.1002/bit.260390308

13. Caron M.M.J., Emans P.J., Coolsen M.M.E., et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012;20:1170–1178. https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016

14. Derakhti S., Safiabadi-Tali S.H., Amoabediny G., Sheikhpour M. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: a comprehensive review. *Materials Science and Engineering C*. 2019;103:109782. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109782

15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493–497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

16. Dou Y., Liang Z., Prajapati M., et al. Expanding diversity of susceptible hosts in peste des petits ruminants virus infection and its potential mechanisms. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:66. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00066

17. Diallo A., Taylor W.P., Lefèvre P.C., Provost A. Attenuation of a strain of peste des petits ruminants virus: candidate for a homologous live vaccine. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 1989;42(3):311–319.

18. Bora M., Yousuf R.W., Dhar P., Singh R.P. Process intensification and thermostabilization for upscaling of peste des petits ruminants vaccines. *VirusDisease*. 2018;29:285–296. https://doi.org/10.1007/s13337-018-0455-3

19. Sarkar J., Sreenivasa B.P., Singh R.P., Dhar P., Bandyopadhyay S.K. Comparative efficacy of chemical stabilizers on the thermostability of live-attenuated PPR vaccine. *Vaccine*. 2003;21:4728–4735. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00512-7

20. Diallo A., Minet C., Le Goff C., et al. The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*. 2007;25:5591–5597. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.013

21. Mahapatra M., Selvaraj M., Parida S. Comparison of immunogenicity and protective efficacy of PPR live attenuated vaccines administered by intranasal and subcutaneous routes. *Vaccines*. 2020;8:168. https://doi.org/10.3390/vaccines8020168

22. Cosseddu G.M., Polci A., Pinoni C., et al. Evaluation of humoral response and protective efficacy of an inactivated vaccine against peste des petits ruminants virus in goats. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2016;63:447–452. https://doi.org/10.1111/tbed.12314

23. Panagopoulos A., Sideri K. From lab to mass production: a policy for enabling the licensing of mRNA vaccines. *Frontiers in Public Health*. 2023;11:1151713. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1151713

24. Gallo-Ramírez L.E., et al. Production of viral vaccines in suspension cultures of Vero cells using microcarriers: advances and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99:2125–2136.

25. Barrett P.N., et al. Vero cell platform in vaccine production: moving toward cell culture–based viral vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2009;8(5):607–618. https://doi.org/10.1586/erv.09.19

VERO СУСПЕНЗИЯЛЫҚ ЖАСУША ӨСІНДІСІНДЕГІ МИКРОТАСЫҒЫШТАР: ҰҚҚМО ВИРУСЫН (NIGERIA 75/1 ШТАМЫ) ТИІМДІ РЕПЛИКАЦИЯЛАУ ЖӘНЕ МАСШТАБТАУ ӘДІСІ

Саметова Ж.Ж.*, Аманова Ж.Т., Тұрыскелді Ш.С., Үсембай А.Қ., Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А.

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
*zh.sametova@biosafety.kz

Аннотация. Бұл мақалада суспензиялық ортада микротасығыштарда өсірілген *Vero* жасуша өсіндісінде ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы (ҰҚҚМО) вирусының (Nigeria 75/1 штамы) көбеюін бағалайтын зерттеулер жүргізілді. Бұл әдіс, микротасығыштардағы адгезивті қасиетпен қамтамасыз етілген жасушалардың жоғары өнімділігін суспензиялық өсірудің артықшылықтарымен ұштастыратын, заманауи платформа болып табылады.

Жүйенің өнімділігіне әртүрлі параметрлердің − вирустың зарарлау дозасы, өсу ұзақтығы, *Vero* жасуша өсіндісінің концентрациясы, микротасығыштардың түрі (Cytodex 1 және Cytodex 3) әсері зерттелінді. Зерттеу нәтижесінде микротасығыштардың *Vero* жасушасының белсенді пролиферациясы мен адгезивтілігін қамтамасыз ететіндігі анықталынды. Өсірілген вирустың титрі (≥ 6,75 lg $ТЦД_{50}$/см³) дәстүрлі моноқабатты өсіру кезінде сипатталған вирус титрінің мәнінен жоғары болуы вирусты өсіру тиімділігінің жоғарылағанын көрсетеді. Алынған зерттеу нәтижелері, тәжірибелік зерттеулерде, өнеркәсіптік әзірлеуде және ҰҚҚМО қарсы вакциналарды өндіруде,

микротасығыштардың өсіру технологиясында қолданылуының жоғары мүмкіншілігі барын растайды.

Түйін сөздер: вирус, ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы, Vero жасуша өсіндісі, суспензиялық өсіру, микротасығыштар.

MICROCARRIERS IN VERO SUSPENSION CELL CULTURE: AN APPROACH FOR EFFICIENT REPLICATION AND SCALE-UP OF PPR VIRUS (NIGERIA 75/1 STRAIN)

Sametova Zh. Zh.*, Amanova Zh. T., Turyskeldy Sh. S., Ussembay A. K., Abitaev R. T., Kondybaeva Zh. B., Bulatov Ye. A.

LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm», Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan
*zh.sametova@biosafety.kz

Abstract. This study assessed the replication of the Nigeria 75/1 strain of the peste des petits ruminants (PPR) virus in Vero cells cultured in suspension using microcarriers. This approach represents a modern platform that combines the advantages of suspension cultivation with the high specific productivity of cells achieved through adhesion to the surface of microcarriers.

The influence of various parameters—type of microcarriers (Cytodex 1 and Cytodex 3), seeding concentration of Vero cells, infectious dose of the virus, and cultivation duration—on the system's productivity was investigated. Experimental results demonstrated that the use of microcarriers ensures reliable adhesion and active proliferation of Vero cells, thereby creating optimal conditions for virus replication. The obtained viral titer (≥ 6.75 log $TCID_{50}/cm^3$) exceeded the values reported for traditional monolayer cultivation, indicating increased efficiency of virus replication. Thus, the obtained data confirm the high potential of cultivation technology using microcarriers both for experimental studies and for industrial development and production of a vaccine against PPR.

Keywords: virus, peste des petits ruminants, Vero cell culture, suspension culture, microcarriers.

МРНТИ 34.15.27 DOI:10.58318/2957-5702-2025-23-13-22

Оригинальная статья

ВЫЯВЛЕНИЕ БРУЦЕЛЛ В КЛЕЩАХ *DERMACENTOR MARGINATUS*

Шыныбекова Г. О., Алмежанова М. Д., Кожабергенов Н. С., Султанкулова К. Т.

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
*sh.gaukhar@biosafety.kz

Аннотация. Клещи являются переносчиками многочисленных патогенов, а их бактериальный состав, численность, разнообразие и взаимодействие влияют как на их рост, так и на эффективность передачи болезней. Появление технологий метагеномного секвенирования нового поколения (NGS) расширило возможности обнаружения и характеристики микробных патогенов. Благодаря анализу данных о последовательностях можно идентифицировать наличие ДНК бруцелл у клещей и определить ее генетические характеристики. В весенний период 2023 года в Таскалинском районе Западно-Казахстанской области, собраны образцы клещей. Секвенирование генов 16S рРНК бактерии в образцах клещей проведено с использованием платформы Ion Torrent по технологии NGS.

В образцах клещей *D. marginatus*_WKR_Taskala метагеномный анализ выявил *Brucella suis bv. 3* (25%) и другие виды *Brucella* (75%). Анализ ридов, полученных в результате метагеномного секвенирования образца клеща идентифицировал 3973 ридов, из которых 2966 классифицированы как *Brucella spp.*, а 1007 – как *Brucella suis bv. 3*. Значения индексов альфа-разнообразия для образца *D. marginatus*_WKR_Taskala составили: Шеннона = 0.797, Симпсона 1−D = 0.473, Маргалефа =