



DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-4-345-353  
УДК 619:616.98:578:57.082.26



# Получение клеточной линии козьего происхождения (*Capra hircus*) TCh как результат кариологической и морфологической трансформации ПЛК ЯДК-04 при субкультивировании с применением сыворотки крупного рогатого скота, обработанной лантаноидами

Е. А. Трофимова, С. В. Кононова, И. Н. Шумилова, Б. Л. Манин

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

## РЕЗЮМЕ

Способность перевиваемых линий клеток к эволюции дает возможность создавать в процессе последовательного культивирования новые трансформированные клеточные культуры, обладающие неограниченным жизненным потенциалом и отличающиеся от исходных прототипов. Универсальных механизмов и способов получения новых клеточных линий практически не существует. Но было замечено, что иммортализация клеток связана с хромосомными перестройками (морфология хроматид) и изменением количества хромосом. Представлены результаты получения новой клеточной линии тестикул козленка *Testis Capra hircus* (TCh), пригодной для эффективной репродукции дерматотропных и других видов вирусов животных, с целью наработки вирусного материала, применяемого для изготовления средств специфической профилактики и диагностики заболеваний животных. Монослойная линия клеток TCh трансформировалась из перевиваемой линии клеток ЯДК-04 в результате проведения более 50 пассажей культивирования в ростовой среде с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, обработанной лантаноидами. Применение сыворотки крови крупного рогатого скота, очищенной и обогащенной лантаноидами, при культивировании постоянной линии клеток ЯДК-04 привело к значительным хромосомным перестройкам и способствовало формированию стабильной и продуктивной новой клеточной линии TCh, которая отличалась по цитоморфологическим и кариологическим признакам и обладала неограниченным потенциалом к пассированию без изменения кариотипа и морфологии клеток. Новая перевиваемая линия клеток оказалась пригодной для эффективной репродукции возбудителей таких болезней, как заразный узелковый дерматит, оспа овец, чума мелких жвачных животных. В основном это вирусы дерматотропного происхождения.

**Ключевые слова:** перевиваемая (постоянная) линия клеток, пролиферативная активность, иммортализация, цитопатическое действие, инфекционная активность

**Для цитирования:** Трофимова Е. А., Кононова С. В., Шумилова И. Н., Манин Б. Л. Получение клеточной линии козьего происхождения (*Capra hircus*) TCh как результат кариологической и морфологической трансформации ПЛК ЯДК-04 при субкультивировании с применением сыворотки крупного рогатого скота, обработанной лантаноидами. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (4): 345–353. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-4-345-353.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Трофимова Елена Александровна, заведующий сектором отдела культуры клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: trofimova\_ea@arriah.ru.

## Goat-derived cell line (*Capra hircus*) TCh generated by karyological and morphological transformation of YaDK-04 CCL during subcultivation with lanthanide-treated bovine serum

E. A. Trofimova, S. V. Kononova, I. N. Shumilova, B. L. Manin

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

## SUMMARY

Ability of the continuous cell lines to evolve enables generation of new transformed cell cultures with unlimited life potential and different from the original prototypes in the process of sequential cultivation. There are practically no universal mechanisms and methods for new cell line generation. But it was noted that cell immortalization is associated with chromosomal rearrangements (chromatid morphology) and changes in the number of chromosomes. The paper presents

© Трофимова Е. А., Кононова С. В., Шумилова И. Н., Манин Б. Л., 2023

the results of the generation of a new *Testis Capra hircus* (TCh) cell line, suitable for effective replication of dermatotropic and other types of animal viruses, in order to scale up viral material used for the manufacture of the means for animal disease specific prevention and diagnosis. The monolayer TCh cell line was transformed from the continuous YaDK-04 cell line as a result of more than 50 passages in the growth medium supplemented with 10% of lanthanide-treated bovine serum. Use of the bovine serum purified and supplemented with lanthanides during the cultivation of the continuous cell line YaDK-04 led to significant chromosomal rearrangements and contributed to the formation of a stable and productive new TCh cell line, which differed in cytomorphological and karyological characteristics and had unlimited potential for passaging without changing the cell karyotype and morphology. The novel continuous cell line proved to be suitable for effective reproduction of such disease pathogens as lumpy skin disease, sheep pox, peste des petits ruminants agents. These are mainly viruses of dermatotropic origin.

**Keywords:** continuous cell line, proliferative activity, immortalization, cytopathic effect, infectious activity

**For citation:** Trofimova E. A., Kononova S. V., Shumilova I. N., Manin B. L. Goat-derived cell line (*Capra hircus*) TCh generated by karyological and morphological transformation of YaDK-04 CCL during subcultivation with lanthanide-treated bovine serum. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (4): 345–353. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-4-345-353.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Elena A. Trofimova, Head of Sector, Cell Cultivation Unit, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets; e-mail: trofimova\_ea@arriah.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Механизмы становления перевиваемых (постоянных) линий клеток (ПЛК) до конца не установлены. Но, в связи с тем что появление неограниченно делящихся (бессмертных) ПЛК довольно частое явление, можно предположить, что механизм формирования постоянных клеточных линий имеет некоторые закономерности, проявляемые в изменении кариологии и морфологии клеток при культивировании *in vitro*. Одной из таких закономерностей является увеличение пролиферативной активности – признак бессмертия (иммортализация), которое наступает к 50-му пассажу после трипсинизации тканей или органов [1, 2, 3]. Вероятно, к этому моменту под действием различных физико-химических и биологических факторов накапливаются изменения, происходящие на хромосомном и генетическом уровнях клеток [4, 5, 6]. Формируется механизм стабильного метилирования гетерохроматина метацентрических участков хромосом и тем самым развивается способность к неограниченному делению основной популяции клеточных линий при соблюдении стабильных условий культивирования [3, 7, 8, 9].

В ветеринарной вирусологии известны три линии клеток козьего происхождения (*Capra hircus*), полученные из гонад козы: CG-91 (КГ-91) [10], ЯДК-04 [11], TCh [12]. В сущности, эти линии – производные одной трипсинизации, которая была проведена в конце 80-х годов XX века. Они сформировались при разных условиях культивирования и воздействии дополнительных химических факторов. Если две первые линии обладают невысокой пролиферативной активностью (кратность рассева 1:2, 1:4), нестабильностью культивирования и околодиплоидным набором хромосом, то третья линия – TCh, полученная с применением обработанной лантаноидами сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС), имеет значительные хромосомные перестройки и превосходит предшественников в продуктивности и стабильности. В настоящем сообщении приводится пример эволюции клеточной линии гонад козы и описывается предполагаемый механизм формирования стабильной и продуктивной ПЛК, пригодной для эффективной репродукции дерматотропных и других вирусов животных.

Целью работы было изучение кариологической и культуральной трансформации клеточной линии TCh, полученной при субкультивировании постоянной клеточной линии ЯДК-04, а также оценка степени чувствительности новой сублинии клеток к вирусам – возбудителям болезней животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток** осуществляли по общепринятой методике в стеклянных и пластиковых сосудах с использованием классических сред MEM, DMEM, DMEM/F-12 с добавлением 10% сыворотки крови КРС, обработанной лантаноидами.

Фенотипирование клеточных линий проводилось с помощью фазово-контрастного микроскопа Olympus CX41 (Япония) и люминесцентного микроскопа МЛ-2Б (Россия).

Для идентификации клеточных культур использовали кариологический метод получения метафазных пластинок по методике P. S. Moorhead [13].

**Вирусный материал.** В работе использовали штамм «ВНД КРС/Дагестан/2015» вируса заразного узелкового дерматита (ЗУД) КРС с инфекционной активностью  $5,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , производственный штамм «ВНИИЗЖ» вируса оспы овец с инфекционной активностью  $5,5 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ , производственный штамм «ВНИИЗЖ» вируса чумы мелких жвачных животных (ЧМЖ) с инфекционной активностью  $5,0 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  [14, 15, 16, 17].

**Культура клеток.** Культивирование вирусов осуществляли в культурах клеток различного происхождения, которые получали из отдела культуры клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Определение инфекционной активности полученного вирусного материала проводили методом титрования с использованием клеточной линии ЯДК-04.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Закономерностей при формировании постоянных клеточных линий козьего происхождения (*Capra hircus*) установлено не было. Использование разнообразных питательных сред и сывороток, длительность пассирования не позволяют выделить значимый фактор,

который бы повлиял на кариологическую и генетическую трансформацию клеточных линий. Первые два трофоварианта, описанных ниже, имеют уникальное происхождение, при этом оказались схожими по характеристикам.

Общеизвестно, что эффективность культивирования клеток связана с качеством питательной среды, ростовые свойства которой в значительной степени зависят от качества сыворотки крови животных в ее составе. В данной работе была использована сыворотка крови КРС, обработанная лантаноидами [18]. Применение лантаноидов в сыворотке еще на стадии ее получения приводит к флокуляции латентных микроорганизмов и эндотоксинов, которые оседают и отделяются сепарированием и ультрафильтрацией. Сами же лантаноиды остаются в среде и участвуют в биохимических процессах культивирования. Длительность пассирования в однородных условиях может привести к определенным изменениям, наблюдаемым при дальнейшем изучении цитоморфологии клеток.

**Характеристика перевиваемой линии клеток гонад козы CG-91.** Единственная постоянная клеточная линия из гонад козы (*Capra hircus*) CG-91, не имеющая аналогов в других странах, была получена в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 1990 г. (патент РФ № 2061753) [10]. Данная ПЛК довольно сложна в культивировании, кратность рассева составляет не более чем 1:2–1:4, имеет модальный класс 59 хромосом. При ее субкультивировании мелкая метацентрическая Y-хромосома практически сразу элиминировалась, и культура сформировалась как псевдодиплоидная.

Получение (становление) ПЛК из органов животных происходит спонтанно, в результате длительного пассирования с применением разнообразных питательных сред, а также при внесении в них сывороток крови животных и использовании некоторых других технологических приемов, связанных с температурой культивирования, способами пересева, длительностью культивирования, применением кондиционированных сред и т. д. [19, 20, 21]. В данном случае клеточная линия CG-91 стабилизировалась как перевиваемая при культивировании на среде DMEM. В качестве добавки использовали по 10% разного вида сыворотки крови КРС, в том числе фетальную. Морфологические особенности ПЛК CG-91 заключаются в том, что в клеточной популяции преобладают веретенообразные клетки с небольшим количеством эпителиоподобных и фибробластоподобных. При пересеве культуры веретенообразные клетки под действием диспергирующего раствора претерпевают фибробластоподобную трансформацию или начинают приобретать сферическую форму, при этом до 20% от общего количества клеток гибнет (рис. 1). Для смягчения процесса трипсинизации в диспергирующий раствор добавляют 0,5% раствора глюкозы. Оставшиеся при пересеве живые клетки репарируются в процессе седиментации и адгезии на субстрат и формируют конфлюэнтный монослой за 3–4 сут.

Клеточная линия CG-91 оказалась чувствительной к вирусу ящура типов А, О, С, Азия-1, а также возбудителю африканской чумы лошадей.

**Характеристика перевиваемой сублинии клеток яичников домашней козы ЯДК-04.** Перевиваемая сублиния ЯДК-04 была получена из ПЛК CG-91 путем направленной селекции с целью повышения биомассы клеток и чувствительности к вирусам животных [11].

Селекция проводилась методом предельного разведения клеточной суспензии при пересеве в пристеночных условиях с применением среды Игла с 0,25% гидролизата лактальбумина.

Используя прием предельного разведения при пересеве клеточной линии, удалось на 36-м пассаже увеличить продуктивность сублинии до 100 млн клеток с культурального флакона площадью 300 см<sup>2</sup>. Морфология клеток и монослоя осталась прежней с преобладанием веретенообразных клеток (рис. 1). Кариотип стал более вариабельным и составил 57–60 хромосом (рис. 2, 3). Преобладающая популяция – модальный класс 59 хромосом (58%).

В результате проведенной селекции расширился список вирусов, которые активно репродуцировались на этой сублинии. Так, титр вируса болезни Ауески достигал 8,0–8,75 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, вируса оспы овец – 5,5–6,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, пневмовируса – 5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Оба описанных трофоварианта клеток гонад козы являются практически диплоидными культурами с минимальными трансформациями в кариотипе и морфологии, кратность рассева которых не превышает 1:4. Также эти ПЛК проявляли периодически депрессивную ростовую активность, требовались смена ростовых ингредиентов и возобновление культивирования из криобанка. Масштабирование этих трофовариантов для получения специфических вакцинных препаратов требовало больших материальных и трудовых затрат.

**Получение новой перевиваемой линии клеток TCh.** Анализируя кариограмму клеточной линии

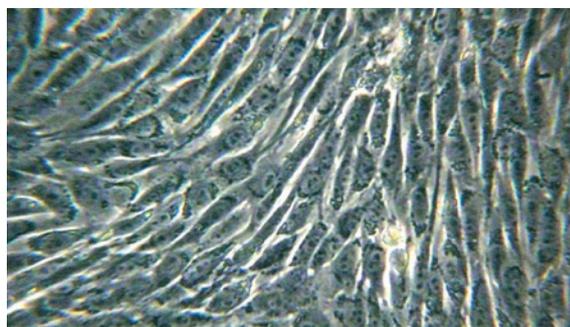


Рис. 1. Морфология клеточной линии ЯДК-04

Fig. 1. YaDK-04 cell line morphology

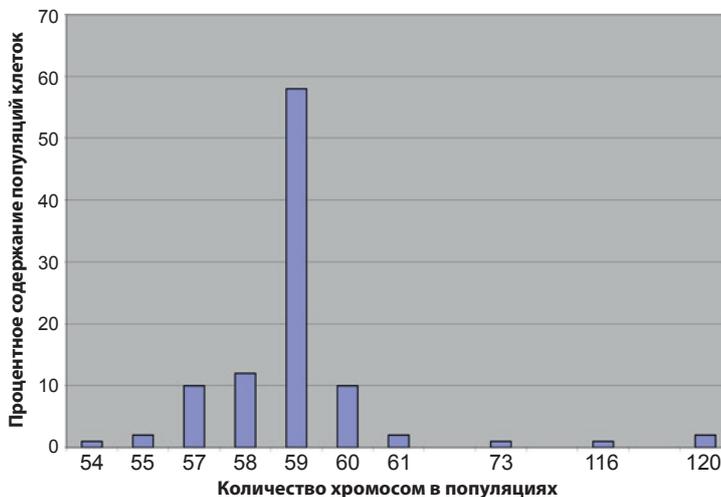


Рис. 2. Кариограмма клеточной линии ЯДК-04

Fig. 2. YaDK-04 cell line karyogram

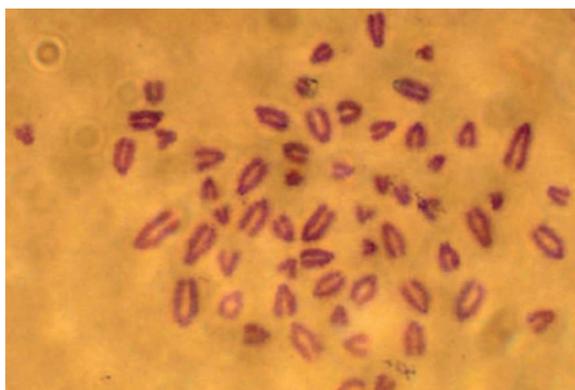


Рис. 3. Метафазная пластинка клеточной линии ЯДК-04 – 59 хромосом

Fig. 3. Metaphase spread of YaDK-04 cell line – 59 chromosomes

ЯДК-04, отметили достаточную вариабельность хромосом в популяциях клеток – от 54 до 120. Этот факт предполагает, что возможна селекция культуры для выделения отличных от предыдущих клонов клеток. Для этой цели в качестве исходного материала использовали монослойную ПЛК яичников домашней козы ЯДК-04, которая отличалась переменной стабильностью в кратности рассева, колебавшейся от 1:2 до 1:4.

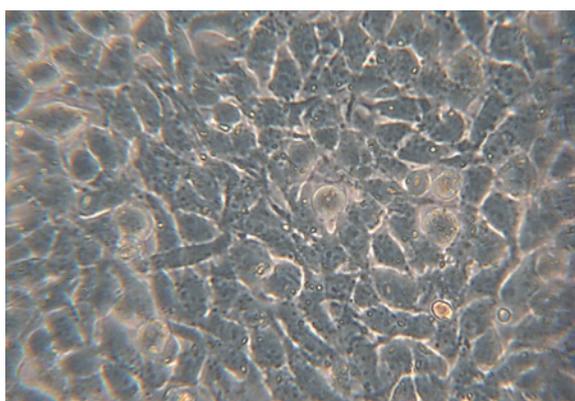


Рис. 4. Морфология ПЛК TCh (70-й пассаж) 48 ч  
Fig. 4. Morphology of TCh CCL (passage 70) 48 hours

С применением в культуральной технологии сыворотки крови КРС, обработанной лантаноидами, появились признаки стабилизации пролиферации пересеваемой линии. Проводилось последовательное длительное пассирование клеточной культуры с циклом 72–96 ч без криопаузы. Параллельно выполнялась работа, направленная на коррекцию свойств сыворотки крови КРС, обработанной лантаноидами. С помощью испытываемой культуры клеток получали информацию о токсичности сыворотки, ее адгезивных свойствах и ростовой активности. Благодаря этому изготовители сыворотки добились элиминации латентных вирусов и эндотоксинов, что значительно улучшило качество формируемого монослоя ЯДК-04 и увеличило продуктивность клеток [18, 21, 22].

Последовательные длительные пересевы ЯДК-04 без криопаузы проводились в стандартных условиях с 10% сыворотки крови КРС, обработанной лантаноидами. К 44-му пассажу стала изменяться морфология клеток: преобладали эпителиоподобные клетки, которые уплотнялись к концу логарифмической фазы роста (рис. 4). На 44-м и 50-м пассажах провели карриологические исследования, в результате которых были обнаружены значительные перестройки в карิโอ типе (рис. 5, 6). Стали преобладать популяции с гиперплоидным набором хромосом и присутствием 2–4 метацентрических элементов (рис. 6, 7). Кратность



Рис. 6. Метафазная пластинка ПЛК TCh-2 (70-й пассаж)  
Fig. 6. TCh-2 CCL metaphase spread (passage 70)

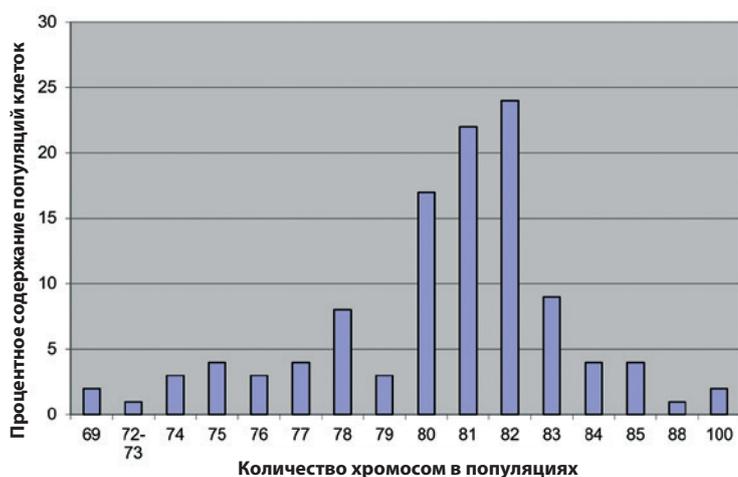


Рис. 5. Картиограмма ПЛК TCh (70-й пассаж)  
Fig. 5. TCh CCL karyogram (passage 70)

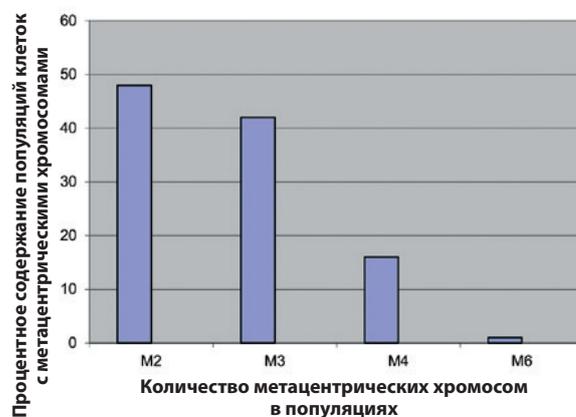


Рис. 7. Процентное содержание популяций клеток с разным количеством метацентрических хромосом в ПЛК TCh  
Fig. 7. Percentage of cell populations with different number of metacentric chromosomes in TCh CCL

рассева увеличилась до 1:6 и более, что сохранилось к 70-му пассажу.

Культивирование более 50 пассажей без криопаузы, увеличение кратности посева, морфологические и кариологические изменения свидетельствовали о получении новой стабильной сублинии тестикул козленка, которую назвали TCh (*Testis Capra hircus*). Эта ПЛК состояла из преобладающих эпителиоподобных клеток, веретенообразные и фибробластоподобные клетки в меньшем количестве концентрировались на подложке между основной популяцией.

После того как полученная сублиния прошла более 70 последовательных пассажей (в течение 18 мес.), признаков дегенерации не наблюдалось, ПЛК характеризовалась стабильными культуральными параметрами.

Длительное культивирование с сывороткой крови, обработанной лантаноидами, привело к значительной трансформации кариотипа. При проведении кариологического анализа сублинии клеток TCh готовили хромосомные препараты с применением метода P. S. Moorhead [13], производили фотографирование 100 метафазных пластинок, подсчет хромосом и составление кариограммы. По результатам исследования выяснили, что сублиния клеток TCh образует гетерогенную по кариологическим признакам популяцию клеток, в основном гиперплоидных. Модальный класс клеток на 50 последовательных пассажах составил 117 хромосом – 14%, околотетраплоидная популяция – 70%, околодиплоидная – 29%. Вариабельность кариотипа – 57–122 хромосомы. На 66-м пассаже появилась новая популяция с преобладанием клеток с модальным классом 82 хромосомы – 24%. На этом кариологическом уровне сублиния стабилизировалась. Эта популяция обладала неограниченным потенциалом к пассированию без существенного изменения кариотипа.

С помощью кариологического анализа, выявления модального класса и появления маркерных хромосом культура идентифицирована как клетки тестикул козленка (*Capra hircus* L.).

**Характеристика перевиваемой линии клеток TCh.** Пролиферативная активность полученной популяции клеток была высокой, что свидетельствует о пригодности сублинии для культивирования в производственных масштабах. Биотехнологические характеристики ПЛК значительно отличались от подобных характеристик исходных линий. Возможность культивирования в роллерах позволила значительно повысить эффективность производства противовирусных специфических препаратов. Потенциал культуры оказался таков, что при остаточном содержании клеток после основного посева популяция восстанавливается до полного монослоя из «пены».

Стабильным признаком новой клеточной популяции кроме гиперплоидности (модальный класс – 82 хромосомы) было появление от 2 до 4 метацентрических хромосом (рис. 6, 7).

В результате селекции с применением сыворотки крови КРС, обработанной лантаноидами, произошла трансформация ПЛК, морфологический статус клеток сублинии TCh значительно отличался от ЯДК-04 и СГ-91. Незменность морфологии ПЛК TCh прослеживалась на протяжении 40 пассажей непрерывного культивирования без криопаузы.

При использовании ПЛК TCh в качестве контроля при изучении цитопатического действия (ЦПД) различ-

ных вирусов без смены среды наблюдались изменения морфологии с признаками старения клеток и монослоя: повышалась грануляция цитоплазмы, межклеточное пространство уплотнялось, появлялись вакуоли, на монослое в небольшом количестве локализовался клеточный детрит. Все эти трофические изменения отличались от специфической дегенерации клеток, вызываемой воздействием вирусов.

**Способы и условия культивирования клеточной сублинии TCh.** Монослойное пристеночное культивирование TCh осуществляется двумя способами: на стационарных горизонтальных поверхностях (в матрасах) и в роллерах (вращающихся сосудах).

Монослойное культивирование в стационарных условиях при температуре (37 ± 0,5) °С – наиболее востребованный способ в производстве культуральных вакцин и вирусологических исследованиях. Линию клеток TCh выращивают в культуральных флаконах с площадью роста 300, 175, 75, 25 см<sup>2</sup>. При необходимости клеточную линию используют в реакции микро-нейтрализации на плашках различной площади.

Последовательное пассирование начинается с разморозки ампулы объемом 5 см<sup>3</sup>, содержащей клетки в концентрации 5–7 млн/мл. Для полученной сублинии TCh отсутствует необходимость смены среды через сутки. Уже через 72 ч клеточная культура формирует полноценный монослой, который можно посеять с кратностью 1:6. Для серийного пассирования используется питательная среда ПСП + 199 (или DMEM/F-12) в соотношении 1:3 и 10% сыворотки крови КРС, обработанной лантаноидами.

При последовательном пассировании, цикл которого составляет 72–96 ч, формируется плотный монослой с частичным наложением эпителиоподобных и сферических клеток.

Активная пролиферация ПЛК TCh происходила в диапазоне pH от 7,3 до 6,8. Закисление ростовой питательной среды ниже 6,8 служит признаком истощения запаса ингредиентов и необходимости пересева или смены среды.

Роллерное культивирование клеток сублинии TCh проводят стационарным способом. При использовании тех же условий и компонентов проводят посев клеток со стационарных культуральных флаконов

**Таблица 1**  
Биотехнологическая характеристика ПЛК TCh

**Table 1**  
Biotechnological specifications of TCh CCL

Площадь роста культурального флакона, см <sup>2</sup>	Тип поверхности	Кратность посева	Срок формирования монослоя, ч	Характеристика монослоя
300	Стекло, пластик	1:4	48	Плотный, с наложением клеток
300	Стекло, пластик	1:6	72	Плотный, с наложением клеток
300	Стекло, пластик	1:8	72–96	Плотный, с наложением клеток
850	Стекло, пластик	1:6,6	72	Плотный
850	Стекло, пластик	1:8,5	72	Плотный
1700	Пластик ребристый	1:12	72–96	Плотный

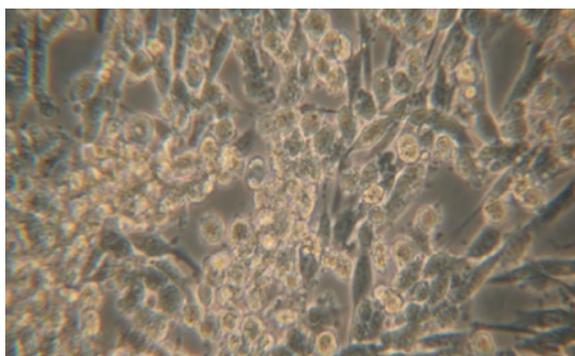


Рис. 8. Клетки монослоя ПЛК TCh после инфицирования вирусом ЗУД КРС  
Fig. 8. TCh CCL monolayer cells post infection with LSD virus

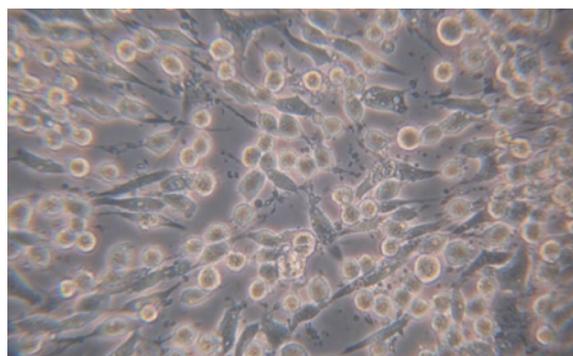


Рис. 9. Клетки монослоя ПЛК TCh после инфицирования вирусом оспы овец  
Fig. 9. TCh CCL monolayer cells post infection with sheep pox virus

с площадью роста 300 см<sup>2</sup> на роллеры с поверхностью роста 850 и 1700 см<sup>2</sup>. Кратность рассева при этом может достигать 1:6,6–1:12 (табл. 1). Оптимальный рассев для получения полноценного и стабильного монослоя равен 1:6. Культура, выращенная роллерным способом, особенно востребована при получении вируса ЧМЖ.

**Репродукция вирусов животных на ПЛК TCh.** Основным результатом получения новой клеточной линии TCh была стабилизация ее культивирования. Линию клеток TCh начали активно использовать с целью масштабного выращивания субстрата для производства вакцинных препаратов против таких заболеваний, как ЗУД КРС, оспа мелких жвачных, ЧМЖ. Каждый из возбудителей вышеперечисленных инфекционных заболеваний животных оказывал свое специфическое ЦПД на культуру клеток TCh.

При репродукции вируса ЗУД КРС в культуре клеток TCh в терминальной стадии происходило отслоение и дегенерация части клеток монослоя. Дегенерированные клетки собирались в агрегаты, но часть монослоя оставалась на подложке. Также в суспензии присутствовали сферические, не полностью разрушенные клетки (рис. 8).

Цитопатический эффект вируса оспы овец отличался от ЦПД вируса ЗУД КРС и проявлялся отслоением ос-

новной части сферических клеток, которые собирались в агрегаты. У оставшихся на подложке клеток наблюдались дегенеративные изменения: они становились веретенообразными и вакуолизировались (рис. 9).

Вирус ЧМЖ вызывал тотальное поражение ПЛК TCh, которое проявлялось в дегенерации отдельных клеток и монослоя в целом до аморфного состояния (рис. 10). В большинстве случаев поражение монослоя достигало 100%.

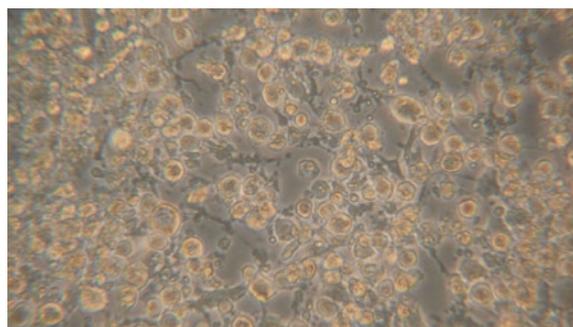


Рис. 10. Клетки монослоя ПЛК TCh после инфицирования вирусом ЧМЖ  
Fig. 10. TCh CCL monolayer cells post infection with PPR virus

Таблица 2

Репродукция вируса ЗУД КРС в различных культурах клеток (n = 3)

Table 2

LSDV replication in various cell cultures (n = 3)

Культура клеток	Инфекционная активность вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>						
	Количество пассажей						
	1	2	3	4	5	6	7
TCh	3,33 ± 0,00	4,16 ± 0,16	4,25 ± 0,18	5,25 ± 0,17	5,30 ± 0,14	5,47 ± 0,16	5,48 ± 0,16
ТЯ	3,02 ± 0,14	4,20 ± 0,16	4,17 ± 0,25	4,50 ± 0,15	5,17 ± 0,14	5,14 ± 0,15	5,17 ± 0,15
FBN	3,01 ± 0,12	3,35 ± 0,15	3,30 ± 0,16	4,17 ± 0,15	4,25 ± 0,16	4,12 ± 0,18	4,00 ± 0,16
SIRC	3,01 ± 0,14	3,15 ± 0,17	3,25 ± 0,12	4,01 ± 0,12	4,15 ± 0,13	4,00 ± 0,15	4,00 ± 0,12
ПТ	3,02 ± 0,12	2,20 ± 0,25	2,15 ± 0,17	1,35 ± 0,17	н/о	н/о	н/о
MDBK	1,25 ± 0,16	1,15 ± 0,13	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Taurus-2	1,27 ± 0,13	1,12 ± 0,14	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
ПО	3,05 ± 0,15	2,17 ± 0,15	1,35 ± 0,17	н/о	н/о	н/о	н/о

н/о – не обнаружен (not detected).

**Сравнительный анализ репродукции вируса ЗУД КРС в различных клеточных культурах.** Для проведения сравнительного исследования использовали следующие клеточные линии: TCh, FBN (перевиваемая культура клеток слизистой носовых перегородок эмбриона КРС), MDBK (перевиваемая культура клеток почки теленка), Taurus-2 (перевиваемая культура клеток почки теленка), SIRC (перевиваемая культура клеток роговицы глаза кролика), ПО (перевиваемая культура клеток почки овцы), ПТ (субкультура почки теленка) и ТЯ (субкультура тестикул ягненка).

Инфекционную активность полученного вирусного материала определяли методом титрования в 96-луночных культуральных планшетах с использованием суспензии культуры клеток ЯДК-04. Учет результатов титрования проводили по цитопатогенному действию вируса в течение 96–120 ч. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в  $\text{lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$ .

Как видно из таблицы 2, максимальное накопление вируса ЗУД КРС регистрировали на уровне 7-го пассажа в гомологичной перевиваемой культуре TCh ( $5,48 \pm 0,16 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$ ) и субкультуре ТЯ ( $5,17 \pm 0,15 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$ ). В культурах клеток FBN и SIRC титр инфекционной активности составил  $4,00 \pm 0,16$  и  $4,00 \pm 0,12 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$  соответственно. Культуры клеток MDBK, Taurus-2, ПО и ПТ оказались нечувствительными к вирусу ЗУД КРС [23, 24].

С целью оптимизации параметров культивирования вируса ЗУД КРС в культурах клеток TCh и ТЯ изучали влияние времени культивирования на репродукцию вируса.

Из данных таблицы 3 видно, что уровень накопления вируса ЗУД КРС в культурах клеток ТЯ и TCh через 72 и 96 ч культивирования существенно не различался и находился в диапазонах от  $5,00 \pm 0,00$  до  $5,08 \pm 0,18$  и от  $5,25 \pm 0,17$  до  $5,33 \pm 0,14 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$  соответственно, однако значительно превышал значения, установленные через 24, 48 и 120 ч культивирования. Полученные данные показывают, что оптимальным сроком культивирования вируса следует считать 72–96 ч.

Таким образом, опытным путем было доказано, что, несмотря на то что степень накопления вируса ЗУД КРС в культуре клеток TCh статистически не отличается от таковой в субкультуре ТЯ, для промышленных целей TCh является более перспективной системой культивирования, так как данная клеточная линия наиболее стабильна и сочетает в себе такие характеристики, как высокая пролиферативная активность, чувствительность к вирусу ЗУД КРС и гомологичность происхождения.

**Сравнительный анализ репродукции вируса оспы овец в различных клеточных культурах.** Для проведения сравнительного исследования использовали следующие клеточные линии: TCh, ПО, ПС (перевиваемая культура клеток почки сайги), ПБ (субкультура почки барана) и ТБ (субкультура тестикул барана) [22, 24, 25, 26]. Было проведено 3 последовательных пассажа.

Инфекционную активность полученного вирусного материала определяли методом титрования в 96-луночных культуральных планшетах с использованием суспензии культуры клеток ЯДК-04. Учет результатов титрования проводили по цитопатогенному действию вируса в течение 72–120 ч. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в  $\text{lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$ .

Как видно из таблицы 4, максимальное накопление вируса оспы овец наблюдали в культурах клеток TCh,

ПБ и ТБ. Титр вируса к 3-му пассажу составил  $5,50 \pm 0,18$ ,  $5,50 \pm 0,25$  и  $5,50 \pm 0,25 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$  соответственно. В культуре клеток ПО и ПС уровень инфекционной активности вируса был невысоким и к 3-му пассажу составлял  $3,25 \pm 0,12$  и  $3,25 \pm 0,25 \text{ lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$  соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сочетание высокой пролиферативной активности, чувствительности к вирусу и гомологичности происхождения делает ПЛК TCh незаменимой в производстве средств специфической профилактики против оспы овец.

**Сравнительный анализ репродукции вируса ЧМЖ в различных клеточных культурах.** В процессе скрининга были использованы следующие клеточные линии: TCh, ПО, ПС, ТК (субкультура тестикул козленка) и СПЭВ (перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи). На каждой клеточной культуре было проведено 5 последовательных пассажей.

Сбор вируса производили при 80–90%-м поражении монослоя клеток. Вирусосодержащий материал каждого пассажа титровали в пенициллиновых флаконах на культуре клеток ЯДК-04 методом последовательных 10-кратных разведений. Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в  $\text{lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$ .

Уже на первых пассажах во всех культурах клеток регистрировали ЦПД вируса, наиболее четко выраженное в клеточной линии TCh (рис. 10). Цитопатические проявления вируса ЧМЖ в культуре TCh заключались в том, что практически все клетки на 3-и сут культивирования деадгезировались, их мембраны и цитоплазма теряли нативную структуру, происходила частичная агрегация клеток.

**Таблица 3**  
Влияние времени культивирования вируса ЗУД КРС в различных культурах клеток ТЯ и TCh ( $n = 3$ )

**Table 3**  
Effect of LSDV cultivation period in various lamb testis cell cultures and TCh ( $n = 3$ )

Время культивирования, ч	Титр вируса, $\text{lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$	
	Культура клеток ТЯ	Культура клеток TCh
24	$2,66 \pm 0,14$	$2,83 \pm 0,22$
48	$3,78 \pm 0,00$	$3,75 \pm 0,17$
72	$5,08 \pm 0,18$	$5,25 \pm 0,17$
96	$5,00 \pm 0,00$	$5,33 \pm 0,14$
120	$4,75 \pm 0,08$	$5,00 \pm 0,00$

**Таблица 4**  
Накопление вируса оспы овец в различных культурах клеток ( $n = 3$ )

**Table 4**  
Sheep pox virus accumulation in various cell cultures ( $n = 3$ )

Культура клеток	Инфекционная активность вируса, $\text{lg TCD}_{50}/\text{cm}^3$		
	Количество пассажей		
	1	2	3
TCh	$5,00 \pm 0,25$	$5,48 \pm 0,16$	$5,50 \pm 0,18$
ПО	$4,20 \pm 0,16$	$4,50 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,12$
ПС	$2,50 \pm 0,25$	$3,08 \pm 0,18$	$3,25 \pm 0,25$
ПБ	$5,00 \pm 0,25$	$5,14 \pm 0,15$	$5,50 \pm 0,25$
ТБ	$5,00 \pm 0,25$	$5,17 \pm 0,14$	$5,50 \pm 0,25$

**Таблица 5**  
Динамика накопления вируса ЧМЖ в различных культурах клеток ( $n = 3$ )

**Table 5**  
Dynamics of PPRV accumulation in various cell cultures ( $n = 3$ )

Культура клеток	Титр вируса, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	
	1-й пассаж	5-й пассаж
TCh	5,25 ± 0,00	5,33 ± 0,18
TK	4,20 ± 0,16	3,50 ± 0,00
СПЭВ	4,15 ± 0,13	4,33 ± 0,18
ПО	4,58 ± 0,14	2,08 ± 0,14
ПС	5,00 ± 0,18	3,33 ± 0,18

Установлено, что наибольшее накопление вируса на всех пассажных уровнях отмечали в клеточной линии TCh (активность вируса находилась в пределах от 5,25 ± 0,00 до 5,33 ± 0,18 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>). Титр вируса в культурах клеток TK и СПЭВ был значительно ниже и составил к 5-му пассажу 3,50 ± 0,00 и 4,33 ± 0,18 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> соответственно. В культурах клеток ПО и ПС на первом пассаже инфекционная активность вируса была достаточно высокой (4,58 ± 0,14 и 5,00 ± 0,18 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> соответственно), но в дальнейшем наблюдали стабильное и последовательное снижение уровня накопления вируса. Так, к 5-му пассажу титр вируса в культуре клеток ПО составил 2,08 ± 0,14 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, в культуре клеток ПС – 3,33 ± 0,18 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (табл. 5).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что оптимальной клеточной линией для репродукции вируса ЧМЖ является культура клеток TCh [12]. Титр вируса, полученный в этой культуре, стабильно находился на высоком уровне в течение пяти последовательных пассажей и составил от 5,25 ± 0,00 до 5,33 ± 0,18 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, что говорит о возможности использования данной культуры клеток для получения вирусного сырья для масштабного производства вакцин на основе изучаемого вируса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное применение обработанной лантаноидами сыворотки крови КРС при культивировании ПЛК ЯДК-04 привело к формированию новой клеточной линии TCh, значительно отличающейся по цитоморфологическим и кариологическим признакам от исходной. По нашему предположению, катионы лантаноидов, обладающие высокой электросорбительностью, влияют на формирование хромосомной изменчивости и нестабильности нуклеосом, особенно на дистальных концах акроцентрических хромосом. Происходит два процесса: появление и стабильная редупликация гиперплоидной популяции клеток, а также соединение акроцентриков с образованием стабильных метацентрических хромосом. Эти перестройки коррелируются с повышением пролиферативной активности линии и стабильностью культивирования при длительном пассировании.

Важным результатом получения новой линии клеток является тот факт, что чувствительность к дерматотропным и другим вирусам не изменилась. А в результате высокой продуктивности клеточных популяций появилась возможность рентабельного производства культуральных вакцин.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Полянская Г. Г. Типы клеточных культур. Образование, основные характеристики и изменчивость клеточных культур. В кн.: *Методы культивирования клеток*. СПб.: Политехнический университет; 2008; 22–40.
- Фрешни Р. Я. Культура животных клеток. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2012. 691 с.
- Хейфлик Л. Смертность и бессмертие на клеточном уровне: обзор. *Биохимия*. 1997; 62 (11): 1380–1393. Режим доступа: [https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/1997/62-11-1380/#\\_pdf](https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/1997/62-11-1380/#_pdf).
- Мамаева С. Е. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. *Цитология*. 1996; 38 (8): 787–814. EDN: MOVXVX.
- Полянская Г. Г. Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 2009; 24: 15–24.
- Полянская Г. Г., Мусорова А. С. Коллекция культур клеток позвоночных: создание, деятельность, каталог. СПб.: Политехнический университет; 2018. 185 с.
- Дункан Э. Л., Реддел Р. Р. Генетические изменения, связанные с им-мортализацией: обзор. *Биохимия*. 1997; 62 (11): 1477–1490. Режим доступа: [https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/1997/62-11-1477/#\\_pdf](https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/1997/62-11-1477/#_pdf).
- Реддел Р. Р., Брайан Т. М., Мернейн Д. П. Иммутизированные клетки без измеримой активности теломеразы: обзор. *Биохимия*. 1997; 62 (11): 1467–1476. Режим доступа: [https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/1997/62-11-1467/#\\_pdf](https://biochemistrymoscow.com/ru/archive/1997/62-11-1467/#_pdf).
- Hess W. R., May H. J., Patty R. E. Serial cultures of lamb testicular cells and their use in virus studies. *Am. J. Vet. Res.* 1963; 24: 59–64. PMID: 13954242.
- Федорова Е. Е., Худяков Г. А., Герасимова Н. И., Герасимов В. Н. Штамм культивируемых клеток гонад *Capra hircus* L. – продуцент вирусов животных. Патент № 2061753 С1 Российская Федерация, МПК С12N5/06, 7/00. Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных. № 94028942/13. Заявл. 02.08.1994. Оpubл. 10.06.1996.
- Герасимов В. Н., Герасимова Н. И., Дьяконов Л. П., Груздев К. Н., Захаров В. М., Манин Б. Л. Линия клеток яичников козы домашней *Capra hircus* L. ЯДК-04 для репродукции вирусов животных. Патент № 2335537 С2 Российская Федерация, МПК С12N 5/06 (2006.01). ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»). № 2006114337/13. Заявл. 26.04.2006. Оpubл. 10.10.2008. Бюл. № 28.
- Манин Б. Л., Трофимова Е. А., Гусарова С. Е., Кононова С. В., Шумилова И. Н., Вологина И. В., Колчанов Н. А. TCh (*Testis Capra hircus*) – перевиваемая, монослойная сублиния клеток тестикул месячного козленка, предназначенная для репродукции вирусов оспы, чумы мелких жвачных и заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота, а также для изготовления диагностических и профилактических ветеринарных биопрепаратов. Патент № 2768962 С1 Российская Федерация, МПК С12N 5/076 (2010.01). ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»). № 20211110116. Заявл. 12.04.2021. Оpubл. 25.03.2022. Бюл. № 9.
- Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battipati D. M., Hungerford D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 1960; 20: 613–616. DOI: 10.1016/0014-4827(60)90138-5.
- Binepal Y. S., Ongadi F. A., Chepkwony J. C. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2001; 68 (2): 151–153. PMID: 11585094.
- The European Collection of Authenticated Cell Cultures. Cell Lines and Hybridomas. Режим доступа: <https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/index.aspx>.
- Carn V. M. Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*. 1993; 11 (13): 1275–1279. DOI: 10.1016/0264-410x(93)90094-e.
- Sheep pox and goat pox. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 3.8.12. Режим доступа: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.08.12\\_S\\_POX\\_G\\_POX.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.12_S_POX_G_POX.pdf).
- Пономарев А. П., Белик Е. В., Манин Б. Л., Коган М. М. Способ очистки сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих агентов. Патент № 2664729 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/49 (2006.01). ООО НПФ «БИОХИМСЕРВИС». № 2017117994. Заявл. 23.05.2017. Оpubл. 22.08.2018. Бюл. № 24.
- Российская коллекция клеточных культур (РККК): каталог. Под ред. Г. П. Пинаева, Г. Г. Полянской. СПб.; 2004. 315 с.
- Манин Б. Л., Коропова Н. В., Трофимова Е. А. Идентификация постоянных клеточных линий животных по кариологическим, морфологическим и культуральным признакам. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2012; 10: 246–254. EDN: PHEUPN.
- Манин Б. Л., Малахова Л. В., Сарбасов А. Б., Мороз Н. В. Цитоморфологические трансформации в клетках ЯДК-04 при взаимодействии с вирусом чумы мелких жвачных животных. *Ветеринария сегодня*. 2019; (2): 41–45. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-41-45.
- Сарбасов А. Б., Манин Б. Л., Яшин Р. В., Шумилова И. Н., Диев В. И. Изучение репродукции вирусов оспы овец и оспы коз в первичных

и субкультивируемых клетках. *Ветеринария сегодня*. 2019; (2): 35–40. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-35-40.

23. Шумилова И. Н., Кононова С. В., Манин Б. Л., Коропова Н. В., Кононов А. В. Культивирование вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота в перевиваемых линиях культур клеток. *Ветеринария*. 2017; 7: 53–57. EDN: ZCCTSD.

24. Kitching R. P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev. Biol. (Basel)*. 2003; 114: 161–167. PMID: 14677686.

25. Zhou J. S., Ma H. L., Guo Q. S. Culturing of ovine testicular cells and observation of pathological changes of the cell inoculated with attenuated sheep pox virus. *Chin. J. Vet. Sci. Tech.* 2004; 34 (9): 71–74.

26. Kalra S. K., Sharma V. K. Adaptation of Jaipur strain of sheeppox virus in primary lamb testicular cell culture. *Indian J. Exp. Biol.* 1981; 19 (2): 165–169. PMID: 7287068.

## REFERENCES

1. Polyanskaya G. G. Types of cell cultures. Cell line generation, main characteristics and variability. In: *Cell cultivation methods*. Saint Petersburg: Polytechnic University; 2008; 22–40. (in Russ.)

2. Freshney R. Ian. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Hoboken: John Wiley and Sons, Inc.; 2005. 672 p.

3. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Moscow)*. 1997; 62 (11): 1380–1393. Available at: <http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v62/full/62111380.html>.

4. Mamaeva S. E. Regularities of cell karyotypic evolution in culture. *Tsitologiya*. 1996; 38 (8): 787–814. (in Russ.)

5. Polyanskaya G. G. Kariotipicheskaja izmenchivost' v kletochnyh liniyah i struktura kariotipa = Karyotypic variability in cell lines and caryotype structure. *Cell cultures. Information bulletin*. 2009; 24: 15–24. (in Russ.)

6. Polyanskaya G. G., Musorina A. S. Collection of vertebrate cell cultures: creation, activity, catalogue. Saint Petersburg: Polytechnic University; 2018. 185 p. (in Russ.)

7. Duncan E. L., Reddel R. R. Genetic changes associated with immortalization. *Biochemistry (Moscow)*. 1997; 62 (11): 1477–1490. Available at: <http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v62/full/62111477.html>.

8. Reddel R. R., Bryan T. M., Murnane J. P. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. *Biochemistry (Moscow)*. 1997; 62 (11): 1467–1476. Available at: <http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v62/full/62111467.html>.

9. Hess W. R., May H. J., Patty R. E. Serial cultures of lamb testicular cells and their use in virus studies. *Am. J. Vet. Res.* 1963; 24: 59–64. PMID: 13954242.

10. Fedorova E. E., Khudjakov G. A., Gerasimova N. I., Gerasimov V. N. Strain of cultured gonad cells *Capra hircus* L. – a producer of animal viruses. Patent No. 2061753 C1 Russian Federation, Int. C12N5/06, 7/00. Vserossiiskij nauchno-issledovatel'skij institut zashchity zhivotnykh. No. 94028942/13. Date of filing: 02.08.1994. Date of publication: 10.06.1996. (in Russ.)

11. Gerasimov V. N., Gerasimova N. I., D'jakonov L. P., Gruzdev K. N., Zakharov V. M., Manin B. L. Ovaries cell line of goat *Capra hircus* L. YDK-04 for reproduction of animal viruses. Patent No. 2335537 C2 Russian Federation, Int. C12N 5/06 (2006.01). FGU "Federal'nyj tsentr okhrany zdorov'ja zhivotnykh" (FGU "VNIIZZh"). No. 2006114337/13. Date of filing: 26.04.2006. Date of publication: 10.10.2008. Bull. No. 28. (in Russ.)

12. Manin B. L., Trofimova E. A., Gusarova S. E., Kononova S. V., Shumilova I. N., Vologina I. V., Kolchanov N. A. TCh (*Testis Capra hircus*), transplantable monolayer subline of testicle cells of a month-old goatling intended

for reproduction of smallpox viruses, plague of small ruminants and infectious bovine nodular dermatitis, as well as for making diagnostic and preventive veterinary biopreparations. Patent No. 2768962 C1 Russian Federation, Int. C12N 5/076 (2010.01). FGBU "Federal'nyj tsentr okhrany zdorov'ja zhivotnykh" (FGBU "VNIIZZh"). No. 2021110116. Date of filing: 12.04.2021. Date of publication: 25.03.2022. Bull. No. 9. (in Russ.)

13. Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. J., Battips D. M., Hungerford D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 1960; 20: 613–616. DOI: 10.1016/0014-4827(60)90138-5.

14. Binopal Y. S., Ongadi F. A., Chepkwony J. C. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2001; 68 (2): 151–153. PMID: 11585094.

15. The European Collection of Authenticated Cell Cultures. Cell Lines and Hybridomas. Available at: <https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/index.aspx>.

16. Carn V. M. Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*. 1993; 11 (13): 1275–1279. DOI: 10.1016/0264-410x(93)90094-e.

17. Sheep pox and goat pox. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 3.8.12. Available at: [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.08.12\\_S\\_POX\\_G\\_POX.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.12_S_POX_G_POX.pdf).

18. Ponomarev A. P., Belik E. V., Manin B. L., Kogan M. M. Method for blood serum purification of large cattle from contaminating agents. Patent No. 2664729 C1 Russian Federation, Int. G01N 33/49 (2006.01). OOO NPP "BIOKHIMSERVIS". No. 2017117994. Date of filing: 23.05.2017. Date of publication: 22.08.2018. Bull. No. 24. (in Russ.)

19. Russian Cell Culture Collection (RCCC): catalogue. Ed. by G. P. Pinayev, G. G. Polyanskaya. Saint Petersburg; 2004. 315 p. (in Russ.)

20. Manin B. L., Koropova N. V., Trofimova Ye. A. Identification of continuous animal cell lines according to the karyological, morphological and cultural characteristics. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2012; 10: 246–254. EDN: PXEUPH. (in Russ.)

21. Manin B. L., Malakhova L. V., Sarbasov A. B., Moroz N. V. Cytomorphological transformations in YaDK-04 cells during interaction with peste de petits ruminants virus. *Veterinary Science Today*. 2019; (2): 41–45. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-41-45.

22. Sarbasov A. B., Manin B. L., Yashin R. V., Shumilova I. N., Diev V. I. Testing sheep and goat pox viruses for their reproduction in primary and subcultured cells. *Veterinary Science Today*. 2019; (2): 35–40. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-35-40.

23. Shumilova I. N., Kononova S. V., Manin B. L., Koropova N. V., Kononov A. V. Reproduction of lumpy skin disease virus in the cell cultures. *Veterinariya*. 2017; 7: 53–57. EDN: ZCCTSD.

24. Kitching R. P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev. Biol. (Basel)*. 2003; 114: 161–167. PMID: 14677686.

25. Zhou J. S., Ma H. L., Guo Q. S. Culturing of ovine testicular cells and observation of pathological changes of the cell inoculated with attenuated sheep pox virus. *Chin. J. Vet. Sci. Tech.* 2004; 34 (9): 71–74.

26. Kalra S. K., Sharma V. K. Adaptation of Jaipur strain of sheeppox virus in primary lamb testicular cell culture. *Indian J. Exp. Biol.* 1981; 19 (2): 165–169. PMID: 7287068.

Поступила в редакцию / Received 19.07.2023

Поступила после рецензирования / Revised 11.08.2023

Принята к публикации / Accepted 05.09.2023

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Трофимова Елена Александровна**, заведующий сектором отдела культуры клеток ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; e-mail: [trofimova\\_ea@arriah.ru](mailto:trofimova_ea@arriah.ru).

**Кононова Светлана Владимировна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3932-2416>, e-mail: [kononova@arriah.ru](mailto:kononova@arriah.ru).

**Шумилова Ирина Николаевна**, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-6132-5771>, e-mail: [shumilova@arriah.ru](mailto:shumilova@arriah.ru).

**Манин Борис Леонидович**, кандидат биологических наук, г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5263-1491>, e-mail: [manin.boria@yandex.ru](mailto:manin.boria@yandex.ru).

**Elena A. Trofimova**, Head of Sector, Cell Cultivation Unit, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; e-mail: [trofimova\\_ea@arriah.ru](mailto:trofimova_ea@arriah.ru).

**Svetlana V. Kononova**, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3932-2416>, e-mail: [kononova@arriah.ru](mailto:kononova@arriah.ru).

**Irina N. Shumilova**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6132-5771>, e-mail: [shumilova@arriah.ru](mailto:shumilova@arriah.ru).

**Boris L. Manin**, Candidate of Science (Biology), Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5263-1491>, e-mail: [manin.boria@yandex.ru](mailto:manin.boria@yandex.ru).