

Джапаралиев Н.Т., Сагындыкова Н.А., Асанбекова А.А.

**КОЗУ БӨЙРӨГҮНҮН КЛЕТКАЛАРЫНЫН КУЛЬТУРАСЫНДАГЫ МАЙДА
КЕПШӨӨЧҮ ЖАНЫБАРЛАРДЫН КАРА ТУМОО ВИРУСУНУН ЖЕРГИЛИКҮҮ
ИЗОЛЯТЫНЫН ЦИТОПАТОГЕНДИК АКТИВДҮҮЛҮГҮ**

Джапаралиев Н.Т., Сагындыкова Н.А., Асанбекова А.А.

**ЦИТОПАТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ МЕСТНОГО
ИЗОЛЯТА ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПОЧЕК ЯГНЕНКА**

N.T. Dzharparaliev, N.A. Sagyndykova, A.A. Asanbekova

**CYTOPATHOGENIC ACTIVITY OF THE LOCAL
ISOLATE OF THE PESTE DES PETITS RUMINANTS VIRUS
IN LAMB KIDNEY CELL CULTURE**

УДК: 916

Бул макалада майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоо сыяктуу ылаңы жөнүндө жана кара тумоо вирусунун жергиликтүү изолятынын цитопатогендик активдүүлүгүн баалоо тууралуу жазылган. Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоо ылаңы Кыргыз Республикасында кой чарбачылыгынын натыйжалуулугун төмөндөткөн инфекциялык оорулардын ичинен өзгөчө мааниге ээ. Майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоо ылаңынын таралуу аймагын эске алсак, бул ылаңды вакциналык препараттардын жардамы менен алдын алуу чоң мааниге ээ болгондугун айтсак болот. Бүгүнкү күндө вакциналар бар, бирок аларды өндүрүш шарттарын оптимизациялоо ар дайым актуалдуу болуп эсептелинет. Иштин башкы максаты болуп майда кепшөөчү жаныбарлардын кара тумоо вирусун бөйрөк клеткаларында өстүрүү мүмкүнчүлүгүн аныктоо жана ошол клетка культурасында репродукцияга активдүү жөнөдөмгө ээ болгон вирустун изолятын бөлүп алуу болуп эсептелинет.

Негизги сөздөр: вирус, кепшөөчү жаныбарлар, кара тумоо, ылаң, клеткалардын культурасы, культивирлөө, вирулент, морбилливирус.

В данной статье речь идет о таком заболевании мелких жвачных животных как чума и оценке цитопатогенной активности местного изолята вируса чумы мелких жвачных животных. Чума мелких жвачных животных (ЧМЖ) занимает особое значение среди инфекционных заболеваний, которые снижают эффективность овцеводства в Кыргызской Республике. Учитывая нозоарел распространения чумы мелких жвачных животных (ЧМЖ), профилактика вакцинальными препаратами заболевания имеет большое значение. На сегодняшний день существуют вакцины, но оптимизация условий изготовления всегда является актуальной. Главной целью работы выступает определение возможности культивирования вируса чумы мелких

жвачных животных в первично-перевиваемых клетках почки ягненка и получение изолята вируса с активной способностью репродукции к этой линии культуры клеток.

Ключевые слова: вирус, чума, мелкие жвачные, культура клеток, культивирование, вирулент, морбилливирус.

In this article, we are talking about the disease of small chewing animals such as plague and the assessment of the cytopathogenic activity of the local isolate of the small chewing animal plague virus. Peste des Petits Ruminants (PPR) is a particularly important infectious disease that reduces the efficiency of sheep farming in the Kyrgyz Republic. Given the nosoareal spread of Peste des Petits Ruminants (PPR), the prevention of the disease with vaccine preparations is of great importance. Today, there are vaccines, but the optimization of manufacturing conditions is always relevant. The main goal of the work is to determine the possibility of cultivating the plague virus of small chewing animals in the primary cells of the lamb kidney and to obtain an isolate of the virus with an active ability to reproduce to this cell culture line.

Key words: virus, small ruminants, plague, cell culture, cultivation, virus, virulent, morbillivirus.

Введение: Peste des petits ruminants (PPR) – это острое заболевание мелких жвачных животных, которое сопровождается такими симптомами как: лихорадка, глазодвигательные выделения, стоматит, диарея и пневмония с зловонным дыханием. Возбудителем заболевания является морбилливирус, относящийся к семейству Paramyxoviridae. Козы и овцы – основные животные, восприимчивые к вирусу. Заболевание приводит к большим экономическим потерям во многих странах, включая Кыргызстан, так как заболеваемость может достигать 100%, а смертность наблюдается до 90% [1]. Из соседних стран, с которыми

ми КР имеет общую границу или тесные экономические связи, наибольшую опасность заноса с их территории вирулентного вируса представляют Таджикистан, Казахстан, Узбекистан и Китай [3]. В Кыргызской Республике ЧМЖ впервые было диагностировано в 2011 году, в трёх областях: Ош, Баткен и Нарын, где преобладает количество поголовья овец и коз [2].

Актуальность: С целью профилактики вышеописанного заболевания в настоящее время широко применяются живые и инактивированные вакцины многих стран мира [4]. В процессе изготовления вакцин и диагностических наборов необходимо получать большие количества вируса. Для размножения вируса чумы мелких жвачных животных в технологии производства вакцинных препаратов используют первичные культуры клеток из органов ягнят, козлят [6]. В этих культурах вирус клеток репродуцируется сравнительно активно, в течение 7-9 суток поражает 70% и более монослоя, накапливаясь в титрах 4,5-5,5 lg ТЦД₅₀/см³ при стационарном методе культивирования [5]. Однако первичные культуры клеток дорогостоящие, сезонные. Использование перевиваемых культур клеток в производстве вирусного сырья имеет ряд преимуществ: возможность поддержания, высокие пролиферативные свойства, чистота от вирусной контаминации и др. В доступной нам литературе нет сведений о репродуцирующей способности вируса чумы мелких жвачных животных в различных перевиваемых культурах клеток, кроме линии клеток ПО (почки овцы), где он размножается менее активно, чем в первичной культуре клеток и накапливается в титрах не более 5,0 lg ТЦД₅₀/см³.

Цель исследования: Целью наших исследований являлось определение возможности культивирования аттенуированного вируса чумы мелких жвачных животных в первично – перевиваемых клетках почки ягненка, которые являются чувствительными к вирусу чумы мелких жвачных животных (ЧМЖ), получение изолята вируса с активной способностью репродукции к этой линии культуры клеток и изучение чувствительности к такому вирусу других перевиваемых культур клеток.

Материалы и методы: В работе использовали аттенуированный изолят, путем последовательного пассирования в первичной культуре клеток почек ягнят, штамм АТ-PPR вируса чумы мелких жвачных животных, первично – перевиваемую культуру клеток почек ягненка (ПЯ), выращенную в пенициллиновых флаконах 0,05 и 1,5 литровых матрасах в питательной среде 199 с 10 % нормальной сыворотки крупного рогатого скота. Получение изолята вируса проводили

методом предельных разведений и адаптаций к репродукции в культуре клеток ПЯ последовательным пассированием через каждые 7-9 суток культивирования.

Репродуктивную активность вируса оценивали по времени появления ЦПД, интенсивности его развития и титру накопления вируса. Для получения изолята использовали разведение вируса на растворе Хенкса на один порядок выше того разведения, которое дает в предельном разведении ЦПД. Полученным разведением вируса инокулировали по 0,1 см³ культуру клеток в пенициллиновых флаконах. Путем ежедневной микроскопии наблюдали за развитием ЦПД вируса. В случае отсутствия патологических изменений в течение 7-9 суток проводили слепой пассаж на свежей культуре клеток. Для проведения пассажа содержимое каждого флакончика после однократного замораживания переносили на монослой культуры клеток в 50 мл флаконах. Пассирование проводили до появления ЦПД в каком-либо флаконе. В случае обнаружения цитопатического изменения содержимое флакона замораживали при -30⁰С, а после оттаивания вносили по 1 см³ на монослой свежей культуры. Последующее пассирование и культивирование вируса осуществляли в культуре клеток в 1,5-литровых матрасах внесением 10 см³ вирусосодержащей культуральной жидкости предыдущего пассажа. Полученная таким путем популяция вируса была принята за отдельный изолят и подвергалась изучению на репродуктивную активность в культуре клеток ПЯ. С целью определения возможности культивирования исследовали способность изолята чумы мелких жвачных животных к репродукции в других перевиваемых линиях клеток: ВНК-21, СПЭВ, IB-RS-2, MDBK, Vero, ПЯ, RBt и Ch-91 путем проведения последовательных пассажей в 1,5-литровых матрасах. Культуры клеток выращивали с использованием соответствующих питательных сред: МЕМ, Игла, 199 и 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота. Пассажи проводили через каждые 10 суток после заражения при отсутствии ЦПД (слепые пассажи). Для очередного пассажа и титрования вируса использовали культуральную жидкость предыдущего пассажа после однократного замораживания и оттаивания. Заражающий объем вируса был одинаков и составлял 10 см³ на матрас. На каждой культуре проведено пять пассажей.

Результаты и обсуждение: В результате проведенных по вышеописанной методике работ цитопатогенное действие вируса в культуре клеток ПЯ было обнаружено только в одном флаконе, на пятом пассаже через 96 часов после заражения в виде одиночного очага поражения, характеризовавшегося темным

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ КЫРГЫЗСТАНА, № 1, 2021

точечным участком на фоне равномерного светлого монослоя клеток. В течение последующих 6 суток ЦПД вируса развивалось сравнительно интенсивно и патологическому изменению, характеризовавшемуся округлением клеток, подвергалось около 40% площади монослоя. На следующем, 6 пассаже, хорошо выраженное множественное ЦПД проявлялось через 3-4 суток, а на 7 сутки вирусиндуцированному поражению подвергалось около 50-60% клеток монослоя. Наблюдение за развитием цитопатогенных изменений в дальнейших пассажах показало значительную репродуктивную активность культивируемого вируса. Результаты наблюдения за проявлением, развитием ЦПД в каждом пассаже и титром накапливаемого вируса в конце срока культивирования приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, на седьмом и восьмом пассажах цитопатогенная активность постепенно нарастала, поражая на каждом последующем пассаже все больше клеток монослоя, а уже с девятого пассажа

цитопатогенному воздействию подвергались практически все клетки монослоя. О постепенном нарастании репродуктивной активности вируса достоверно подтверждали титры его накопления, которые повышались от пассажа к пассажи, с 5,5 lg ТЦД₅₀/см³ - на шестом и седьмом пассажах до 6,5 lg ТЦД₅₀/см³ на девятом и десятом. Наблюдения за динамикой цитопатогенной активности и накоплением вируса показывают, что с момента первоначального проявления ЦПД на пятом пассаже до восьмого и девятого пассажа сроки проявления его сокращались, а интенсивность развития цитопатологии и титр вируса возрастали. В последующих двух пассажах эти показатели были уже стабильны. Вирус в зараженной культуре клеток через 72 часа вызывал ЦПД, а в последующие 96 часов подвергались дегенеративному изменению практически все клетки монослоя. Титр вируса в этот период в культуре клеток ПЯ был стабильно высок и равнялся 6,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Таблица 1

Цитопатогенная активность местного изолята вируса чумы мелких жвачных животных в пассажах на культуре клеток ПЯ

№ пассажей	Культуральный Сосуд	Заражающая доза вируса, см ³	Сроки появления ЦПД, сут	Сроки максимального развития ЦПД и сбора вируса	Характер и интенсивность ЦПД		Титр вируса ТЦД ₅₀ /см ³
					% поражения клеток	Характер ЦПД	
I	пениц.фл.	0.1	-	(4)	-	-	-
II	50 мл фл.	1	-	(11)	-	-	-
III	50 мл фл.	1	-	(9)	-	-	-
IV	50 мл фл.	1	-	(7)	-	-	-
V	50 мл фл.	1	4	9	40	сравнительно с контрольными клетками набухшие, интенсивно преломляющие свет, на монослое участками множество сгруппированных округлых, светящихся клеток	2,5
VI	1,5л матр.	10	4	7	50-60	По всей поверхности монослоя образование симпластов, округление и вакуолизация клеток с последующей деструкцией и отслоением клеток от стекла	5,5
VII	1,5л матр.	10	3-4	7	60-70	Практически все клетки монослоя округлились, образуя конгломераты, только местами имеются здоровые клетки	5,5
VIII	1,5л матр.	10	3	7	70-80	Выраженная деструкция монослоя	6,0
IX	1,5л матр.	10	3	7	90	Практически полная деструкция монослоя	6,5
X	1,5л матр.	10	3	7	90	- " -	6,5

Примечание: в скобках указаны сроки замораживания зараженных культур клеток без развития ЦПД.

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ КЫРГЫЗСТАНА, № 1, 2021

При проведении исследований по определению возможности культивирования клонированного вируса чумы мелких жвачных животных местного изолята в других перевиваемых культурах клеток ВНК-21, СПЭВ, IB-RS-2, MDBK, Vero, ПЯ, RBt и Ch-91 было установлено отсутствие в пассажах на всех культурах

специфических дегенеративных изменений. В культуре ПЯ вирус размножился и накапливался в титрах $2,5-3,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В клетках Vero происходило незначительное размножение вируса ($1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) в первом пассаже при отсутствии репродукции в остальных. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты исследований возможности культивирования местного изолята вируса чумы мелких жвачных животных в различных перевиваемых культурах клеток

№ п/п	Культуры клеток	Среда выращивания и поддержания клеток	Наличие ЦПД и титр вируса в пассажах				
			1	2	3	4	5
1.	Ch-91	МЕМ	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$
2.	ПЯ	МЕМ+199	$\frac{-}{2.50}$	$\frac{-}{2.75}$	$\frac{-}{2.50}$	$\frac{-}{3.00}$	$\frac{-}{2.75}$
3.	IB-RS-2	ИГЛА	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$
4.	Vero	МЕМ	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{1.0}$
5.	СПЭВ	ИГЛА	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$
6.	ВНК-21	ИГЛА	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$
7.	MDBK	ИГЛА	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$
8.	RBt	ИГЛА	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$	$\frac{-}{0.0}$

Примечание: числитель-наличие ЦПД; знаменатель - титр вируса.

Заключение: Таким образом, в результате проведенных исследований получен изолят вируса чумы мелких жвачных животных, который выделен путем “слепого пассирования” предельных разведений исходного вируса. Указанный изолят проявил свою цитопатогенную активность на пятом пассаже в культуре клеток почек ягненка и в течение последующих дополнительных 3-4 пассажей полностью адаптировался к репродукции в использованной культуре клеток. Адаптированный вирус активно размножился в перевиваемой культуре клеток почек ягненка и накапливался в титре $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, который значительно превышал уровень накопления его в традиционно применяемых культурах клеток [3,4,5].

Перевиваемая культура клеток ПЯ является наиболее эффективной из исследуемых системой для репродукции изолята вируса чумы мелких жвачных животных.

Литература:

- <http://www.fao.org/ppr/background/ru/>
- Руководство по диагностике, профилактике и борьбе с чумой мелких жвачных животных. - Б., 2019. - С. 4.
- Книзе А.В., Болгова М.В., Тураев Р.А., Абдулоев А.О., Балышев В.М. Анализ эпизоотической ситуации и моделирование потенциальных нозоареалов оспы и чумы мелких жвачных животных до 2020 г. // Ветеринарный врач. – 2016. – № 1. – С.11-16.
- Hermann M., Beach N.M., Meng X.J., Wang C., Halbur P.G., Opriessnig T. A live-attenuated and an inactivated chimeric porcine circovirus (PCV) 1-2 vaccine are both effective at inducing a humoral immune response and reducing PCV2 viremia and intrauterine infection in female swine of breeding age // Can. J. Vet. Res. – 2014. - №78 (1) - P. 8-16.
- Абдураимов Е.О., Мамбеталиев М., Кутумбетов Л.Б. Изучение свойств вируса чумы мелких жвачных животных в клеточных культурах. // Биотехнология. Теория и практика. – 1998. - №1-2. - С. 5-6.
- Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Оспа коз // Вирусные болезни животных. - Москва: ВНИТИБП, 1998. - С. 740-741.
- Нургазиев Р.З., Кошембетов Ж.К., Крутская Е.Д. Получение чистых препаратов вируса чумы мелких жвачных животных // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. - 2015. - №5. - С. 90-93.