

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ СҮЙЕЛДІ ДЕРМАТИТ ВИРУСЫНЫҢ «DERMATITIS NODULARIS BOVUM /2018/ KOSTANAY/ KZ» ШТАММЫН ӨСІРУДІҢ ТИІМДІ ПАРАМЕТРЛЕРІН АНЫҚТАУ

А.Ж. Рагатова*¹ , Е.О.Абдураимов² 

¹ «А. Байтұрсынов атындағы Қостанай өңірлік университеті, Қостанай қ., Қазақстан

² АҚ «QazBioPharm» Ұлттық Холдингі», Астана қ., Қазақстан

*ainyr_81@mail.ru

Аннотация. Мақалада сүйелді дерматит вирусының «Dermatitis nodularis bovim/2018/Kostanay/KZ» штаммын қозы бүйрегі, қозы тестикуласы, сиыр эмбрионының бүйрегі (MDBK), сириялық жаңа туған аламанның бүйрегі (ВНК-21), африкалық жасыл маймыл (Vero) бүйрегінен алынған жасуша өсінділеріне өсіру және осы аталған штаммның таңдалған жасуша өсіндісінде вирусты өсірудің тиімді параметрлерін анықтау бойынша зерттеу нәтижелері келтірілген. Зерттеу нәтижелері бойынша сыналған жасуша өсінділерінің арасынан аталған вирусты өсіруге қозы бүйрегі мен қозы тестикуласынан алынған жасуша өсінділері жоғары сезімталдылық көрсетті. Таңдап алынған жасуша өсіндісінде вирусты өсірудің тиімді параметрлері анықталып, соның ішінде жұқтыру дозасы – $0.1 \div 0.001$ ТЦД₅₀/кл; өсіру температурасы – 36.5°C; қансарысуының концентрациясы – 2%; өсіру мерзімі – 96-144 сағ болды. Осы анықталған тиімді өсіру параметрлерінің негізінде жасуша өсіндісінде өсірілген штаммның инфекциялық белсенділігі $10^{6.10-6.25}$ lg ТЦД₅₀/см³ аралығында болды. Сонымен қатар вирусты трипсинделген алғашқы жасуша өсінділерінде 10 сериялық пассажаға дейін өткізу процессі кезінде вирус аталған жасушаға бейімделіп, жасушада цитопатологиялық өзгерістер туындатып, вирустық массаны максималды алуға мүмкіндік берді. Зерттеу нәтижелері болашақта сүйелді дерматит вирусына қарсы профилактикалық және диагностикалық препараттарды әзірлеуде кеңінен қолдануға болады.

Түйін сөздер: сүйелді дерматит вирусы; жасуша өсіндісі; өсіру параметрлері; жұқтыру дозасы; температура.

Кіріспе

Ірі қара малдың (ІҚМ) сүйелді дерматиті – сиырлардың аса жұғымтал, трансшекаралық вирустық ауруы. Инфекция сиырларда дененің қызуымен, лимфа жүйесінің зақымдалуымен, теріасты клетчаткалардың домбығуымен, теріде түйіндердің (бұдырмақ) пайда болуымен, жыныс мүшелері функциясының бұзылуымен, асқорыту, тынысалу мүшелерінің кілегейлі қабықтарының жарақаттануымен сипатталады [1, 2].

Бұл вирустық инфекцияның қоздырғышы *Poxviridae* тұқымдастығына, *Capripoxvirus* туысына, *Neethling* вирус тобына жататын ДНҚ-вирус. *Neethling* вирус сүйелді дерматит қоздырғышының прототипі болып табылады. Бұл патоген ешкі шешегі вирусымен антигендік туыстығы бар [1-3]. Сонымен қатар, вирустың екі басқа тобы (*Allerton* және *BLD*), ертеректе сүйелді дерматиттің қоздырғышы болып саналып келді. Бірақ, соңғы кезде *Allerton* және *BLD* вирустары сүйелді дерматиттің шын қоздырғышы емес екені дәлелденді. *Neethling* вирусы морфологиялық тұрғыдан ешкі шешегі вирусымен бірдей, дөңгелек пішінде, қос қабатты қабықшамен қапталған, әрі өзегі тығыз болып келеді. Вирионның мөлшері 320-260 нм құрайды [4]. Африка және Таяу Шығыс сияқты ауру шыққан елдерден жеткен ақпараттарға сүйенсек, сүйелді дерматит маусым мен қыркүйек айларында тіркелген. Бұл жағдай қансорғыш жәндіктердің жаз мезгілінде белсенді ұшуымен байланысты болуы мүмкін [5, 6].

Індет алғаш рет 1929 ж. Солтүстік Родезияда байқалды, ал клиникалық симптомдары 1931 ж. сипатталды [1]. Сүйелді дерматиттің тарихи нозоареалы Оңтүстік, Шығыс (Гвинея,

Мозамбик, Ботсвана, Зимбабве және Оңтүстік Африка республикасы) және Солтүстік Африка елдеріне (Египет, Бахрейн, Кувейт, Оман) таралды [5]. Инфекция 1960-шы жылдары Израил, Палестина және Ливанда анықталды. Артынша Иордания, Сауд Арабия, Түркия, Греция и Сирияда тіркелді. Түркияда 2013 пен 2014 жылдардың аралығында 325 ауру ошағының тіркелгенін Халықаралық Эпизоотиялық Бюро (ХЭБ) хабарлады. Сол уақытта індет ошағы Израил, Ливан, Иордания, Палестина, Ирак және Мысырда тіркелді. Ұлттық ветеринария қызметінің деректері бойынша 2014 жылы ІҚМ сүйелді дерматиті ошағы Түркияда – 230, Ливанда - 32, Әзербайжан және Иракта - 16, Мысыр мен Иранда - 6 ошақтан тіркелген [7]. Кипр мен Грекияда ауру 2014-2015 жылдары анықталған. ХЭБ деректері бойынша ІҚМ сүйелді дерматиті 2013 пен 2015 жылдары аралығында Таяу Шығыстың 12 еліне таралып үлгерсе, ал 2015 жылы Ресей Федерациясының территориясында (Дағыстан, Шешенстан и Солтүстік Осетия-Алания) тіркелді [8].

ІҚМ сүйелді дерматиті Қазақстанда (Атырау обылысында) 2016 жылы тіркеліп [9], ауру жұқтырған мал саны 6894 құрады, оның 5 750 симптоматикалық емдеу жүргізілсе, 1 119 сиыр аурудан өлді. Мал құнын өтеу үшін иелеріне республикалық бюджеттен 176,5 млн теңге бөлінген. [10].

Бұл ауруға қарсы арнайы емдеу әдісі жоқ. Ғылыми әдебиеттердегі деректер бойынша аурудан табиғи түрде жазылуы 90% құрайды. Ауруға симптоматикалық ем қолданылады. Ауру малдарға жақсы бағып-күту шаралары жасалады, дәрумендерге байытылған азық-жеммен бағылады, малқораларды дезинфекциялық құралдармен өңдейді. Ауырып жазылған малдарда төзімді иммунитет түзіліп, ол өз кезегінде малдың қайтадан ауруын болдырмайды [6]. Қазіргі кезде ІҚМ сүйелді дерматитімен күресудің бірнеше принципіалды схемалары бар. Еуропада (Греция, Болгария және Македония) бұл ауруды жою үшін барлық ауруға бейім жануарларды союға жібереді (stamping-out әдісі) [2]. Бірақ аталған елдерде аурудың оқтын-оқтын байқалып отыруы, бұл күресу әдісінің тиімділігінің төмендігін көрсетіп отыр. Кейбір елдерде ауру ошағын жою үшін модифицирленген stamping-out әдісі қолданылады. Нақтырақ айтқанда, ауырған және ауру жұқтырған малдарды жаппай сойып, қатер төнген аймақта (10-50 км) сақиналық вакцинация жүргізу қолға алынған [4]. Сондықтан инфекциямен күресудің ең тиімді жолы ауруға қарсы бейім жануарларды егу болып табылады. Қазіргі кезде сүйелді дерматитке қарсы әлемде оның *Neethling* вирусынан әзірленген вакциналармен қатар, туыстас вирустар болып саналатын қой мен ешкі шешегінің вирустары да тиімді нәтижелер көрсеткен [11, 12].

Инфекция қоздырғышы қансорғыш жәндіктер (кене, шыбын) арқылы таралып ауру малдан сау малға механикалық және басқа да жолдармен берілетіндігі әдебиеттерде деректер көптеп кездеседі [13-15]. Ғылыми әдебиеттерде вирустың биологиялық қасиеттері жөнінде де мәліметтер жеткілікті. Дегенмен де инфекцияға қарсы профилактикалық, диагностикалық құралдарды жасау үшін, сонымен қатар ғылыми мақсатта да вирустың культуралық қасиеттерін зерттеу өте маңызды. Себебі, вакциналық және диагностикалық құралдарды жасауда табысқа жету – көбінесе вирусты өсірудің сезімтал жүйесінің сәтті таңдалуына тәуелді. Көптеген зерттеулерде сүйелді дерматит вирусын өсіру үшін *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus* тектен алынған жасуша өсінділерімен қатар қозы, бұзау, бұқа, атжалман және т.б. жануарлардың бүйректері мен тестикулаларынан алынған жасуша өсінділері өте сезімтал болып келеді. Осыған байланысты біз осы зерттеуімізде Қостанай облысында 2018 жылы сүйелді дерматитпен ауырған малдан бөліп алған вирустың штамының жасуша өсіндісінде өсіру параметрлерін анықтауды мақсат еттік.

Материалдар мен әдістемелер

Вирус штаммы. Зерттеу жұмысына Қостанай облысында сүйелді дерматитпен ауырған сиырдан бөліп алған «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммы қолданылды. Аталған штамм ҚР ДСМ Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институтының (БҚПҒЗИ) Микроағзалар коллекциясында депонирленген (инв№). Штамм кептірілген күйде ампулада сақталған, инфекциялық белсенділігі $6,25 \pm 0,11 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Жасуша өсінділері және қоректік орталар. Зерттеуге БҚПҒЗИ Жасуша биотехнологиясы зертханасында сақталған тұрақты және трипсинделген алғашқы жасуша өсінділері: Африка жасыл маймылының (Vero), жас бұқаның (MDBK), қой (ПО), қозы бүйректері мен тестикуласынан алынған жасуша өсінділері қолданылды. Трипсинделген алғашқы жасуша өсінділері БҚПҒЗИ-ның модификациясымен жалпыға белгілі әдіс бойынша [16] өсіріп алынды. Тұрақты себілмелі жасуша өсінділерін 0,02% версен ерітіндісін қолданып жүйелі себу арқылы өсірілді. Осы аталған жасуша өсінділерін өсіруге БҚПҒЗИ әзірленген ПСП қоректік ортасы және Игла-МЕМ қоректік ортасы қолданылды. Көрсетілген қоректік орталарға алдын-ала 56°C температурада 30 мин қыздырылған ІҚМ қан сарысуын 2% мөлшерде және антибиотиктер (бензилпенициллин – 100 ӘБ, стрептомицин сульфаты – 100 мг/см³, нистатин – 0,25 ӘБ/см³) қосылды. Бұл компоненттерден басқа глутамин – 600 мкг/см³ мөлшерде, ал қоректік ортаның рН мәнін 7,2-7,6 келтіру үшін 7,5% натрий бикарбонаты ерітіндісі қосылды.

Вирусқа сезімтал жасуша өсіндісін және вирусты өсірудің тиімді параметрлерін анықтау. Жоғарыда көрсетілген жасуша өсінділерінің сүйелді дерматит вирусына сезімталдығын тексеру үшін зерттеулер жүргізілді. Зерттеу барысында жасушаларды вируспен тиімді жұқтыру дозасын анықтау үшін 0,0001 ТЦД_{50/кл}, 0,001 ТЦД_{50/кл}, 0,01 ТЦД_{50/кл}, 0,1 ТЦД_{50/кл}, 1,0 ТЦД_{50/кл} дозалары қолданылып жұқтырылды. Жасушаларды жұқтырғаннан кейін оларды әртүрлі температураларда 33±0,5 °C, 36,5±0,5 °C, және 39±0,5°C инкубация жүргізілді. Қоректік ортаның құрамындағы қансарысуының әртүрлі мөлшерінің жасуша өсіндісіне және вирустың жинақталуына әсерін білу мақсатында қансарысуының 1%, 2% 5% 10% мөлшерде қосылған қоректік орта және қансарысуы қосылмаған қоректік ортаның ықпалы зерттелді. Жасушалардың вирусқа сезімталдық дәрежесін жасушалық моноқабатта вирустың цитопатологиялық әсерінің пайда болуына қарай бағаланды. Жасушалық қабатта вирустың цитопатологиялық өзгерісі байқалмаса немесе әлсіз болса жасушаларды 10-14 тәулікке дейін бақыланады. Жасушаларда вирустың жинақталу деңгейін анықтау үшін вирустың инфекциялық белсенділігін жасушада титрлеу әдісі арқылы анықтап, нәтижесін Reed & Muench әдісімен есептеп, lg ТЦД_{50/см³} белгіленді.

Зерттеу нәтижелерін статистикалық өңдеу. Зерттеу нәтижелерінің сенімділігін қамтамасыз ету үшін барлық эксперименттерді кемі үш мәрте қайталанып, сандық деректердің орташа арифметикалық мәні және стандарттық қателері GraphPad® (АҚШ) компьютерлік бағдарламасымен статистикалық өңделді.

Зерттеу нәтижелері

Вирустың әртүрлі жасуша өсінділеріне сезімталдығын зерттеу

Сүйелді дерматит вирусының «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммына әртүрлі жасушалардың сезімталдығын зерттеудің нәтижелері 1-кестеде берілді.

Кесте 1 – Сүйелді дерматит вирусының «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штамына жасушалардың сезімталдығын бағалау нәтижелері

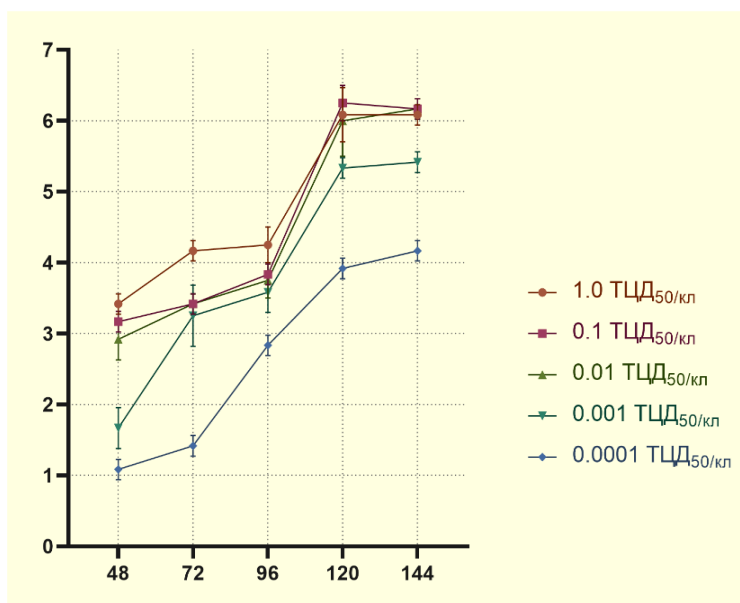
Жасуша өсіндісі	Жасуша типі	Жасуша өсінділерінің вирусқа сезімталдығын бағалау көрсеткіштері			
		Вирустың ЦПӨ байқалу уақыты, сағ	Өсіру мерзімі, тәулік	Жасушалық қабаттың зақымдалу аумағы, %	Вирустың титрі, ТЦД _{50/см³} lg
ҚЗБ	трипсин	48-50	5	85-90	6.10±0.16
ҚЗТ	трипсин	48-50	5	85-90	6.25±0.00
ҚЭБ	тұрақты	60	7	70-80	4.25±0.22
ТБ	тұрақты	50	6	80-90	5.25±0.16
ТТ	тұрақты	50	6	80-90	5.25±0.13

Vero	тұрақты	60-72	7	80-90	4.50±0.11
MDBK	тұрақты	55-60	6	80-90	4.75±0.12
ВНК-21	тұрақты	60-65	6	80-90	3.75±0.11
Ескертулер: «трипсин» - трипсинделген алғашқы жасуша өсіндісі «тұрақты» - тұрақты себілмелі жасуша өсіндісі					

Зерттеу нәтижелері бойынша аталған штаммға тексерілген жасушалардың арасынан трипсинделген алғашқы жасуша өсінділері (ҚЗБ, ҚЗТ) тұрақты себілмелі жасуша өсінділеріне қарағанда сезімталдылық көрсетті. Вирустың бұл жасушаларға ЦПӘ жұқтырғаннан кейін 48-50 сағ басталып, 5-тәулікте жасушалық қабаттың 85-90% зақымдады (кесте 1). Вирустың трипсинделген жасуша өсінділеріндегі цитопатологиялық белсенділігі 6.00-6.25 lg ТЦД₅₀/см³ аралығында болды. Тұрақты себілмелі жасуша өсінділері вирусқа сезімталдығы төмендеу болды, себебі вирустың жасушаларға цитопатологиялық әсері сәл баяулау жүрді, сонымен қатар вирустың өсіру мерзімі де ұзаққа созылды. Бұл жасуша өсінділерінде вирустың белсенділігі 3.75-5.25 lg ТЦД₅₀/см³ аралығын құрады. Ең төменгі вирустың титрі ВНК-21 жасушасында байқалды (3.75±0.11 lg ТЦД₅₀/см³) болды.

Жұқтыру дозасына байланысты вирустың жасуша өсіндісінде жинақталу деңгейі

Көптеген вирусологиялық зерттеулерде, соның ішінде жаңадан бөліп алған штамдарды зерттегенде жасушаға тиімді жұқтыру дозасын анықтау басты факторлардың бірі. Себебі, белсенділігі жоғары вирустық биомасса алуда көбіне жұқтыру дозасына байланысты болады. Осыған байланысты жаңадан бөлінген «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммының әр түрлі дозасымен ҚЗБ жасуша өсіндісін зарарлау арқылы оның көбею динамикасы зерттелді. Зерттеу нәтижелері 1-суретте көрсетілген.



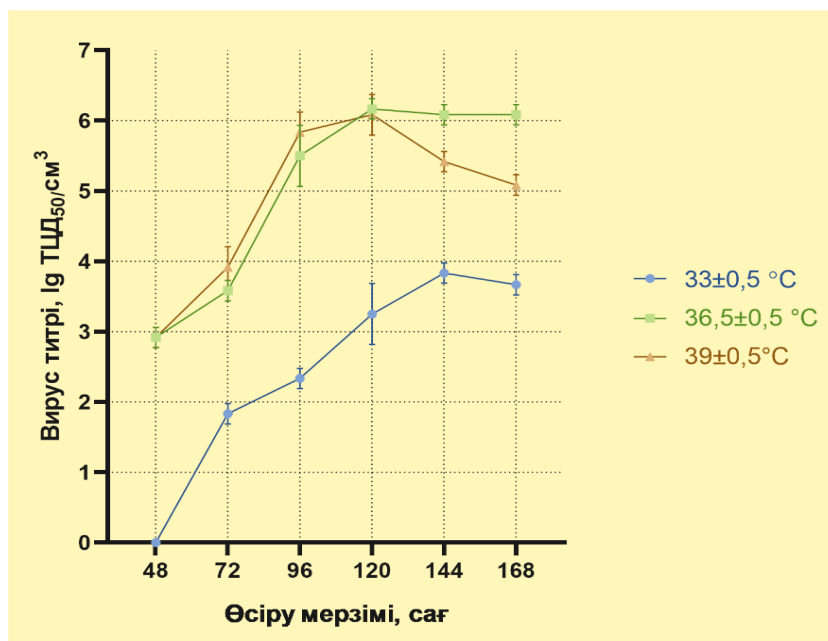
Сурет 1 – Сүйелді дерматит вирусы «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммының жұқтыру дозасына байланысты ҚЗБ жасушасындағы инфекциялық белсенділігі

Вирустың 1.0-ден 0.001 ТЦД₅₀/см³ дейінгі дозаларда жұқтырылған жасушада вирустың жинақталу деңгейі 120-144 сағ шамамен бір деңгейде 10^{6.00}÷10^{6.25} ТЦД₅₀/см³ құрады. Бұл дозаларда вирустың титрінде маңызды айырмашылық байқалған жоқ (p≥0.05). Ал вирустың 0,0001 ТЦД₅₀/кл дозасында вирустың жинақталуы айтарлықтай мөлшерде төмен болып, титрі 10^{3.91}÷10^{5.41} ТЦД₅₀/см³ болды. Бұл дозада сонымен қатар вирустың өсу кезеңі жасушаларды жұқтырған кезден бастап жасушалық қабаттың көп аумағын зақымдағанға дейін артты. Сонымен, жұқтыру дозасына қарай ҚЗБ жасуша өсіндісінде өсірілген «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммының көбею сипаты айтарлықтай ерекшеленді. Қысқа мерзім

ішінде белсенділігі жоғары вирустық материал алу үшін 0,1-ден 0,01 ТЦД₅₀/кл дейін вирустың дозалары жасушаларды жұқтыру үшін тиімді болып есептелді.

Әртүрлі температурада вирусты жасуша өсіндісінде өсіру кезіндегі вирустың жинақталу деңгейі

Вирустың жасуша өсіндісінде көбеюіне белгілі бір дәрежеде температура да ықпал ететіні белгілі, сондықтан белсенділігі жоғары вирустық материал алу технологиясында вирустың репродукциясына тиімді температуралық режимді анықтаудың маңызы өте зор. Осы фактордың ықпалын анықтау үшін аталған штамды әртүрлі температуралық режимде жасуша өсіндісінде өсіру кезіндегі жинақталу динамикасының нәтижелері 2-суретте көрсетілді.



Сурет 2 – Сүйелді дерматит вирусының «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штамның температуралық режимге байланысты жасуша өсіндісінде жинақталу деңгейінің нәтижелері

Суреттегі зерттеу нәтижелеріне сүйенсек, сүйелді дерматит вирусы 36,5±0,5 °C және 39±0,5 °C температураларда 120 сағ ең жоғары шегіне жетіп, вирустың титрі $10^{6,0 \pm 0,25}$ lg ТЦД₅₀/см³ құрады. Бірақ, вирустың титрі 36,5±0,5 °C температурада 144-166 сағ соңғы титрі сақталса, ал 39±0,5 °C температураларда вирустың титрі $10^{5,50 \pm 0,00}$ lg ТЦД₅₀/см³ дейін төмендеген. Сонымен қатар, бұл температурада жасушалық моноқабат жоғары температура әсерінен дезагрегациясы байқалды. Ал төменгі температурада (33±0,5 °C) вирустың жасушаға цитопатологиялық әсері баяу жүріп, жасушалардың зақымдануы 72 сағатта пайда болды. Бұл температурадағы вирустың титрі 144 сағ $10^{3,75 \pm 0,88}$ lg ТЦД₅₀/см³ құрады.

Сонымен сүйелді дерматит вирусының «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штамын өсіру үшін сынақтан өткізілген температуралық режимнің арасынан 36,5±0,5 °C температура таңдалып алынды.

Қоректік орта құрамындағы ІҚМ қансарысуы мөлшерінің жасуша өсіндісінде вирустың жинақталуына әсері

Қоректік орта құрамындағы ІҚМ қан сарысуының вирустың репродукциясына әсерін білу мақсатында қансарысуының әртүрлі концентрацияда қосылған қоректік ортада вирус өсірілді. Бұл үшін ҚЗБ жасуша өсіндісін өсіріп алғаннан кейін, жасуша өсірілген ыдыстардағы ескі өсіруші қоректік ортаны төгіп, одан кейін жасушалар вируспен жұқтырылды. Әрі қарай жұқтырылған жасушаларға әртүрлі концентрацияда қансарысуы қосылған қоректік ортаны құйып 36,5±0,5 °C температурада 5-6 тәулік бойы инкубацияланды. Содан соң жасушаларға мұздату-ертіту процедуралары жүргізіліп, вирустың биологиялық белсенділігі анықталды. Зерттеу нәтижелері 2-кестеде келтірілді.

Кесте 2 - ІҚМ қансарысуы мөлшерінің вирустың жасуша өсіндісіндегі репродукциясына әсерін зерттеу нәтижелері

Қоректік орта құрамындағы қан сарысуы мөлшері, %	Жасуша өсіндісінде вирустың ЦПӨ байқалуы, сағ	Вирусты өсіру кезеңі, (сут)	Вирус титрі lg ТЦД50/см ³ n=3 (X±m)
1,0	72	6	5,58±0,16
2,0	72	6	5,88±0,16
5,0	72	6	5,83±0,15
10,0	72	6	5,66±0,17
Қан сарысуынсыз	72	5	4,83±0,22

Кестедегі көрсетілген нәтижелерге қарасақ, қан сарысуының барлық концентрациясында вирустың титрі шамамен бірдей деңгейде ($10^{5,58}$ –ден $10^{5,83}$ ТЦД50/см³ дейінгі аралықта), яғни вирустың жасуша өсіндісінде жинақталу деңгейі қоректік орта құрамындағы қансарысуының мөлшеріне тәуелсіз болды. Ал қан сарысуы қосылмаған қоректік ортада жасуша өсіндісінің жылдам көмескіленіп, дезагрегациясы байқалды. Осының салдарынан вирустың титрі $10^{4,83}$ ТЦД50/см³ шамасында болды.

Сонымен сүйелді дерматит вирусының «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммын өсіру үшін қоректік орта құрамына ІҚМ қан сарысуының 2% мөлшері тиімді деп саналып, алдағы уақытта вирусты өсіруге ІҚМ қан сарысуының 2% мөлшері қолдану тиімді деп саналды.

Жасуша өсіндісінде вирусты пассаждау кезіндегі цитопатологиялық белсенділігі

Вирусты жасуша өсіндісінде тізбекті пассаждан өткізу – вирустың репродукциялық сипатының өзгеруіне әкеліп, нәтижесінде вирустың жасуша өсіндісінде жинақталу деңгейінің төмендеуіне немесе керісінше жоғарылауына әкеліп соқтырады. Осы гипотезаны анықтау үшін сүйелді дерматит вирусының «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммын әртүрлі жасуша өсінділерінде 10 рет тізбекті пассаждан өткізу арқылы зерттеу жүргізілді. Ол үшін трипсинделген алғашқы жасуша өсіндісі және тұрақты себілмелі жасуша өсінділері қолданылды. Зерттеу нәтижелері 3-кестеде берілді.

Кесте 3 – Жасуша өсінділерінде тізбекті пассаждан өткізілген вирустың цитопатологиялық белсенділігін анықтау нәтижелері

Жасуша өсіндісі	Пассаж деңгейі	Өсіру мерзімі, тәулік	Жасуша қабатының зақымдалу аумағы, %	Вирус титрі, lg ТЦД50/см ³ (X±m)
ПЯ	1	5-8	80-90	5,18±0,11
	5	4-6	80-90	5,56±0,10
	10	4-5	80-90	5,75±0,10
Vero	1	6-9	60-70	4,32±0,07
	5	5-7	60-70	5,00±0,22
	10	5-6	60-70	4,87±0,07

Кестеде келтірілген нәтижелерден сүйелді дерматит вирусы ҚзБ және ҚзТ жасуша өсінділерінде тізбекті пассаждан өту кезінде цитопатологиялық әсері тежелместен белсенді түрде көбейетінін көруге болады, бұл кезде вирус титрі $10^{5,18}$ -ден $10^{5,75}$ ТЦД50/см³ дейін ауытқитыны байқалған, әрі вирустың титрінің азаю тенденциясы байқалмады. Бұл жасуша

өсіндісінде вирусты өсіру мерзімі де аса қатты өзгермеген. Ал вирусты Vero жасушасында тізбекті пассаждан өткізу кезінде вирустың цитопатиялық белсенділігі шамамен бастапқы деңгейде қалады. Бірақ вирустың титрінің аздап төмендеуі байқалды. Жалпы жүргізілген зерттеулер сүйелді дерматит вирусының «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штаммының цитопатиялық белсенділігінің осы жасуша дақылдарында дәйекті өту кезінде біркелкі өзгермейтінін көрсетті. ҚЗБ жасуша өсіндісінде вирусты пассаждау кезінде вирустың жинақталу деңгейі біршама тұрақты болды. 5-ші пассаждан бастап аталған жасуша өсіндісінде вирустың жинақталу дәрежесінің жоғарылауы байқалды.

Талқылау

Каприпоксвирустарды өсіруге қатысты ғылыми әдебиеттерді талдау барысында қозы бүйрегі мен тестикуласынан алынған жасуша өсінділері каприпоксвирустардың өкілдеріне өте сезімтал болып келеді [17-20]. Дегенмен де аталған аталған тұқымдастықтың өкілдерін өсіру үшін тауық эмбрионы да эмбебеп өсіру жүйе болып табылады [21]. Каприпоксвирустар, соның ішінде сүйелді дерматит вирусы тауық эмбрионының хорио-аллантоис қабықшасында ақ дақты зақымдаулар түзе отырып көбейетіні дәлелденген [22]. Бірақ тауық эмбрионында өсіру орындалуы жағынан және экономикалық жағынан өте тиімсіз биологиялық жүйе болып табылғандықтан біз сүйелді дерматит вирусын жасуша өсінділерінде өсіруге тырыстық. Себебі көптеген авторлардың [23-26] зерттеулері бойынша жасуша өсіндісі каприпоксвирустарға, соның ішінде сүйелді дерматит вирусына қарсы вакциналық және диагностикалық құралдар дайындау үшін вирустық биомасса өндіруге ең қолайлы, қолжетімді, әрі арзан субстрат болып табылады. Осыған байланысты біздің осы зерттеуімізде әртүрлі жануар текті жасуша өсінділерінің вирусқа сезімталдық деңгейлерін зерттеу ғылыми қызығушылық тудырды. Сүйелді дерматит вирусын бөліп алу және өсіру үшін қой мен бұзаудың бүйрек және тестикула ұлпалары, қоянның эмбрионы тері және бүйрек ұлпалары, ересек мартышка мен сирия атжалманының бүйрек жасушалары кеңінен қолданылады. Аталған жасуша өсінділерінде вирус жасуша қабаттарын ыдыратып, жасушалар дөңгеленеді, зақымдалған жасуша қабаттарының өсінділері ыдыс қабырғасынан ажырап, 72–96 сағ ішінде жасушаларды толығымен жояды [24, 25]. Біз зерттеуге алған жасуша өсінділерінде дәл осындай өзгерістер орын алды. Бұл жасушалардың арасында вирусқа ең сезімталдық көрсеткені қозы бүйрегі мен тестикуласынан алынған жасуша өсінділері болды. Қалған жасушаларда вирус цитопатологиялық өзгерістер туындатқанымен вирустың белсенділігі алдыңғы екі трипсинделген алғашқы жасуша өсінділеріне қарағанда төмен болды. Осы жағдайды, соның ішінде Vero жасушасында поксвирустардың өсуінің өте баяу жүретінін Babiuk et al [27] өз зерттеулерінде атап өткен, және аталған жасушада вирустың титрінің өте төмен болатынын дәлелдеген. Осыған ұқсас тағы бір зерттеуде сүйелді дерматит вирусының үндістанда бөлінген изоляты Vero жасушасына бейімдеу кезінде 3-пассаж жүргізсе де жасушада вирустың цитопатологиялық өзгерістері байқалмаған, бірақ цитопатологиялық өзгерістер 15-пассаждан бастап нақты көрінген [28]. Ал басқа зерттеуде MDBK мен Vero жасушаларын салыстырмалы түрде сүйелді дерматит вирусының египеттік штамына сезімталдығын тексеру барысында алдыңғы зерттеуге қарама-қайшы нәтиже алып, Vero жасушасын аталған вирусты өсіруге ұсынған [29]. Түйе шешегі вирусын да Vero жасушасында өсіру кезінде вирустың цитопатологиялық әсері жылдам байқалып, жасушалардың дезагрегациясы анық көрінгенімен вирустың титрі ПЯ жасушасымен салыстырғанда екі есеге дейін төмен болған [30].

Вирустарды өсіру бойынша көптеген зерттеулердің нәтижелері бойынша вирустың репродукциясы үшін негізгі факторлар болып саналатын тиімді өсіру шарттарын (жұқтыру дозасының алуандылығы, өсіру температурасы, өсіру тәсілі, қоректік орта және оның құрамы т.с.с.) сәтті анықтаған жағдайда ғана белсенділігі жоғары вирустық массаны алуда барынша жетістіктерге қол жеткізуге болатыны дәлелденген [24-26, 31]. Соның ішінде вирустың жасушада жеткілікті мөлшерде жинақталуының жұқтыру дозасының санына байланысты екені де зерттеулерде көрсетілген [31]. Біздің зерттеуімізде 1.0-ден 0.001 ТЦД₅₀/кл дейінгі

дозаларда вирустың титрі салыстырмалы түрде жоғары болды. Ал ең төменгі дозада (0.0001 ТЦД₅₀/кл) сәйкесінше вирустың титрі де төмен болды. Сонымен вирустың «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штамы үшін тиімді жұқтыру дозасы болып 0.1÷0.001 ТЦД₅₀/кл аралығы саналды. Ал 1.0 ТЦД₅₀/кл дозасында да вирустың титрі жоғары болса да қабылданбады, себебі, жоғары доза жасушаларды тез зақымдайды, әрі вирусты серилық пассаждау кезінде болашақта бос вириондардың қалыптасуына жол ашып, вирустың фентоиптік қасиеттерінің өзгеруімен қатар, аутоинтерференция дамуы салдарынан вирустың репродукциясы тежеліп «Магнус феномені» байқалады [30] деген тұжырым жасалды.

Вирустардың жасушада көбеюі температураға да байланысты, әрі бұл вирустың геномымен реттеледі. Көптеген вирустардың көбеюі үшін 36-37 °С ең тиімді температура болып саналады. Бұл зерттеуде 36.5±0.5 °С мен 39.0±0.5°С температураларда вирустың титрі бірдей болды, әрі төменгі температурамен салыстырғанда жоғары болды. Вирустың жоғары температурада (39.0±0.5°С) ешқандай тежелусіз репродукциялануы болашақта жоғары температураға төзімді термостабильді штамды алуға мүмкіндік ашуы мүмкін. Дегенмен де вирустың «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штамын өсіруге тиімді температура ретінде 36.5±0.5 °С алынды.

Жасуша өсіндісінде вирустардың көп мөлшерде жинақталуы тек жасуша түріне, өсіру температурасы мен доза санына байланысты ғана емес қоректік ортаға да, соның ішінде қансарысуының мөлшеріне де байланысты. Себебі, қан сарысуының қоректік орта құрамында болмауы жасушаларға қан сарысуы құрамындағы кейбір қоректік заттардың жетіспеушілігінен жасушалардың структурасы бұзылып, нәтижесінде жасушалардың тез қартаю процесін жылдамдатып, вирустардың репродукциясына ықпалын тигізуі мүмкін. Ал қан сарысуының қоректік орта құрамында шамадан тыс болуы салдарынан қан сарысуы құрамындағы кейбір спецификалық емес ингибиторлар вирустың репродукциясын тежеуі мүмкін [31]. Сол себепті, бұл зерттеуде вирусты өсіруге ең тиімді қансарысуының мөлшері 2% болып қабылданды.

Қорытынды

Сонымен зерттеу барысында Қостанай облысында 2018 жылы ауру малдан бөлініп алынған «*Dermatitis Nodularis Bovum /2018/Kostanay/kz*» штамын өсіру үшін қозы бүйрегі мен тестикуласынан трипсинделіп алынған алғашқы жасуша өсінділері өтес сезімталдылық көрсетті. Таңдап алынған жасуша өсіндісінде вирусты өсірудің тиімді параметрлері анықталып, соның ішінде жұқтыру дозасы – 0.1÷0.001 ТЦД₅₀/кл; өсіру температурасы – 36.5°С; қансарысуының концентрациясы – 2%; өсіру мерзімі – 96-144 сағ болды. Зерттелген штамм Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институтының Микроағзалар коллекциясына депонирленді.

Қолданылған әдебиеттер

1. MacDonald, R.A.S., 1931: Pseudo-urticaria of cattle. Annual Report for 1930. Department of Animal Health, Northern Rhodesia, 20–21.
2. World organization for Animal Health. Lumpy Skin Disease. // OIE Terrestrial Manual 2012, Chapter 2.4.14., 762-776. - Paris, France, 2012, Vol. 1- 2.
3. Акулов А.В., Апатенко В.М., Архипов Н.И. и соавт., Кожная бугорчатка /Патологоанатомическая диагностика вирусных болезней крупного рогатого скота. М.; Агропромиздат, 1987, 147-149.
4. EFSA ANAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), 2015. Scientific Opinion on lumpy skin disease. EFSA Journal 2015;13(1):3986, 73 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3986
5. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Кононов А.В. и соавт. Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани, 2015, 5, 3-6.
6. Закутский Н.И., Балышев В.М., Юрков С.Г., Гузалова А.Г., Луницин А.В. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота: характеристика возбудителя болезни,

распространение, диагностика и меры борьбы (обзор литературы). Ветеринарный врач, № 4, 2016. С.3-12

7. Семакина В.П., Жильцова М.В., Саввин А.В., Акимова Т.П. Распространение заразного узелкового дерматита (нодулярного дерматита) крупного рогатого скота в мире. Ветеринария сегодня. 2017;(3):13-23.

8. Borisevich S.V., Sizikova T.E., Petrov A.A., Karulin A.V., Lebedev V.N. Nodular Dermatitis: Emergence of Novel Poxviral Infection in Russia. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; 1:5–11. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-5-11

9. Orynbayev M.B. Lumpy skin disease in Kazakhstan / M.B. Orynbayev, R.K. Nissanova, S.K. Kopeyev, A. Issimov, K.D. Zakarya, K.T. Sultankulova, L.B. Kutumbetov, A.B. Tulendibayev, B. Myrzakhmetova, E.D. Burashev, O.V. Chervaykova, S.S. Nurabayev, A.K. Nakhanov, R.A. Kock // Tropical Animal Health and Production. 2021. Vol. 53. 166 p. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02613-6>

10. <http://www.inform.kz/ru/vakcinu-dlya-skota-ot-nodulyarnogo-dermatita-zhdut-v-atyraua3008217> от 21.08.2017

11. Tuppurainen E, Dietze K, Wolff J, Bergmann H, Beltran-Alcrudo D, Fahrion A, Lamien CE, Busch F, Sauter-Louis C, Conraths FJ, De Clercq K, Hoffmann B, Knauf S. Review: Vaccines and Vaccination against Lumpy Skin Disease. Vaccines (Basel). 2021 Oct 6;9(10):1136. doi: 10.3390/vaccines9101136. PMID: 34696244; PMCID: PMC8539040.

12. Черных О.Ю., Мищенко А.В., Мищенко В.А., Шевкопляс В.Н. Специфическая профилактика нодулярного дерматита крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани, №3, 2016, с.3-5

13. Namazi F, Khodakaram Tafti A. Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: A review. Vet Med Sci. 2021 May;7(3):888-896. doi: 10.1002/vms3.434. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33522708; PMCID: PMC8136940.

14. Gupta T, Patial V, Bali D, Angaria S, Sharma M, Chahota R. A review: Lumpy skin disease and its emergence in India. Vet Res Commun. 2020 Nov;44(3-4):111-118. doi: 10.1007/s11259-020-09780-1. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32857262.

15. Issimov A., Kutumbetov L., Orynbayev M.B., Khairullin B., Myrzakhmetova B., Sultankulova K., White P.J. Mechanical Transmission of Lumpy Skin Disease Virus by Stomoxys Spp (Stomoxys Calsitrans, Stomoxys Sitiens, Stomoxys Indica), Diptera: Muscidae. Animals (Basel). 2020 Mar 12;10(3):477. doi: 10.3390/ani10030477. PMID: 32178349; PMCID: PMC7143779.

16. Строганова, И.Я., Трухоненко А.А. Использование в вирусологии культуры клеток: метод. указания / Строганова И.Я., Трухоненко А.А.; Краснояр. гос. аграр. ун-т. Красноярск, 2013. – 48 с.

17. Nitzschke E., Buckley L., Ergin H. Isolation and titration of sheep and goat pox viruses in sheep thyroid cell cultures // Vet. Rec. 1967. 81. – P.216-217.

18. Rafyi A., Ramyar H. Goat pox in Iran: serial passage in goats and developing egg and relationship with sheep pox // J. Comp. Path. 1959. V.69. – P.141-147.

19. Мищенко А.В., Караулов А.К., Мищенко В.А. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота. Ветеринария, 2016, 4: 3-6.

20. Балышева В.И., Живодеров С.П., Пивова Е.Ю., Бобровская Н.К., Живодерова А.В., Анисимова Л.И., Кушнир С.Д., Усадов Т.Р., Юрков С.Г., Сальников Н.И., Луницин А.В. Пермиссивность культур клеток различного происхождения при культивировании вируса нодулярного дерматита. // Сельскохозяйственная биология, 2017, том 52, 6, с. 1265-1272

21. van Rooyen PJ, Munz EK, Weiss KE. The optimal conditions for the multiplication of Neethling-type lumpy skin disease virus in embryonated eggs. Onderstepoort J Vet Res. 1969 Dec;36(2):165-74. PMID: 5408795.

22. House, J.A., Wilson, T.M., E.I. Nakashly, S., Karim, I.A., Ismail, I., E.I. Danaf, N., Moussa, A.M., & Ayoub, N. N. (1990). The isolation of lumpy skin disease virus and bovine herpesvirus 4 from cattle in Egypt. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2, 111– 115.
23. Б.Ш. Мырзахметова, Л.Б. Кутумбетов, А.К. Наханов, М. Азанбекова, М.Б. Орынбаев, К.Т. Султанкулова. Чувствительность клоновых популяций клеточной культуры тестикул ягнят к вирусу нодулярного дерматита // *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный)*. - 2020. - №1 (104). - С.131-141
24. Кутумбетов Л.Б., Мырзахметова Б.Ш., Шманов Г.С. Чувствительность первичных культур клеток из почек и тестикул ягнят и козлят к вирусу нодулярного дерматита// «Ізденістер, нәтижелер - Исследования, результаты». № 4 (80) 2018. - С.10-15.
25. Нисанова Р.К., Рыстаева Р.А., Керимбаев А.А., Омарова З.Д., Орынбаев М.Б. Выбор чувствительной системы культивирования вируса нодулярного дерматита КРС// «Ізденістер, нәтижелер - Исследования, результаты». № 4 (80) 2018. - С.26-32.
26. Кутумбетов Л.Б., Мырзахметова Б.Ш. Результаты принудительной адаптации клеток тестикул и почек ягнят и козлят к непрерывному росту in vitro// «Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина». № 4 (99)/2018. - С.96-104.
27. Babiuk S, Parkyn G, Copps J, Larence JE, Sabara MI, Bowden TR, Boyle DB, Kitching RP. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *J Vet Diagn Invest*. 2007 Sep;19(5):486-91. doi: 10.1177/104063870701900505. PMID: 17823391.
28. Kumar N, Chander Y, Kumar R, Khandelwal N, Riyesh T, Chaudhary K, Shanmugasundaram K, Kumar S, Kumar A, Gupta MK, Pal Y, Barua S, Tripathi BN. Isolation and characterization of lumpy skin disease virus from cattle in India. *PLoS One*. 2021 Jan 11;16(1):e0241022. doi: 10.1371/journal.pone.0241022. PMID: 33428633; PMCID: PMC7799759.
29. Mashaly M.M., El-Deeb A.H., Shahein M.A., Hussein H.A. (2020): Comparative growth kinetic of Egyptian LSDV isolate in Vero and MDBK cell line. *Journal of Virological Sciences*, Vol. 7: 66- 76.
30. Zhugunissov K, Mambetaliyev M, Sarsenkulova N, Tabys S, Kenzhebaeva M, Issimov A, Abduraimov Y. Development of an Inactivated Camelpox Vaccine from Attenuated Camelpox Virus Strain: Safety and Protection in Camels. *Animals (Basel)*. 2023 Apr 30;13(9):1513. doi: 10.3390/ani13091513. PMID: 37174551; PMCID: PMC10177572.
31. В.А. Сергеева и Е.А. Непоклонова и Т.И. Алипер в монографии «Вирусы и вирусные вакцины», Москва «Библионика» 2007. С. 209.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА ВИРУСА БОРОДАВЧАТОГО ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА «DERMATITIS NODULARIS BOVUM/ 2018/ KOSTANAY / KZ»

А.Ж. Рагатова*¹ , Е.О.Абдураимов² 

¹НАО «Костанайский региональный университет имени А. Байтұрсынұлы»,
г. Костанай, Казахстан

²АО «Национальный Холдинг «QazBioPharm», г. Астана, Казахстан
*ainyr_81@mail.ru

Аннотация. В статье приведены результаты исследований по культивированию вируса нодулярного дерматита в культурах клеток, полученных из почки и тестикулы ягненка, почки эмбриона крупного рогатого скота (MDBK), почки новорожденного сирийского хомячка

(ВНК-21), почки африканской зеленой мартышки (Vero) и определение оптимальных параметров культивирования штамма данного вируса в выбранной культуре клеток. По результатам исследований установлено, что среди тестируемых культур клеток, полученных из почек и тестикулы ягнят, показали высокую чувствительность к культивированию данного вируса. Также в результате исследований были определены оптимальные параметры культивирования вируса в культуре клеток, в том числе заражающая доза - $0,1 \div 0,001$ ТЦД₅₀/кл; оптимальная температура культивирования - 36,5°C; содержание сывороток в составе питательной среды - 2%; срок культивирования 96-144 ч. На основании этих установленных оптимальных параметров культивирования инфекционная активность данного штамма составила от $10^{6,10}$ до $10^{6,25}$ lg ТЦД₅₀/см³. Кроме того, во время проведения вируса в трипсинизированных первичных культурах клеток до 10 последовательных пассажных генераций, вирус адаптируется к указанной клетке, вызывая цитопатологические изменения в клетке, также позволило получить максимальную вирусную массу. Полученные результаты исследований могут быть широко использованы в дальнейшем при разработке профилактических и диагностических препаратов против вируса нодулярного дерматита КРС.

Ключевые слова: вирус бородавчатого дерматита; рост клеток; параметры культуры; доза заражения; температура.

DETERMINATION OF EFFECTIVE PARAMETERS FOR THE CULTIVATION OF A STRAIN OF BOVINE WARTY DERMATITIS VIRUS «DERMATITIS NODULARIS BOVUM/ 2018/ KOSTANAY / KZ»

A.ZH. Ragatova ^{1*} , E.O. Abduraimov ² 

¹NJSC «A. Baitursynuly Kostanay Regional University», Kostanay, Kazakhstan

²JSC «National Holding «QazBioPharm», Astana, Kazakhstan

*ainyr_81@mail.ru

Abstract. The article presents the results of studies on the cultivation of lumpy skin disease virus in cell cultures obtained from the kidney and testicle of a lamb, the kidney of an embryonic cattle (MDBK), the kidney of a newborn Syrian hamster (BHK-21), the kidney of an African green monkey (Vero) and the determination of optimal cultivation parameters of the strain of this virus in the selected cell culture. According to the results of the research, it was found that among the tested cell cultures obtained from the kidneys and testicles of lambs, they showed high sensitivity to the cultivation of this virus. Also, as a result of the research, the optimal parameters for cultivating the virus in cell culture were determined, including the infecting dose - $0.1 \div 0.001$ TCD₅₀/cell; the optimum cultivation temperature is 36.5°C; serum content in the composition of the nutrient medium - 2%; cultivation period 96-144 hours. Based on these established optimal cultivation parameters, the infectious activity of this strain ranged from 106.10 to 106.25 lg TCID₅₀/cm³. In addition, during the holding of the virus in trypsinized primary cell cultures for up to 10 successive passage generations, the virus adapts to the specified cell, causing cytopathological changes in the cell, which also made it possible to obtain the maximum viral mass. The obtained results of the research can be widely used in the future in the development of preventive and diagnostic drugs against the lumpy skin disease virus CRS.

Keywords: verrucous dermatitis virus; cell growth; culture parameters; infection dose; temperature.