

DOI: 10.26104/NNTIK.2022.48.95.028

Эркинова З.Э., Джапаралиев Н.Т.

А ЖАНА О ТИБИНДЕГИ ШАРП ВИРУСУН КУЛЬТИВИРЛӨӨ

Эркинова З.Э., Джапаралиев Н.Т.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПОВ А И О

Z. Erkinova, N. Djaparaliev

CULTIVATION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS STRAINS A AND O TYPES

УДК: 619:616.98:578.835.2-085.371:636.22/28

Бодо малдын жана койдун жара түрүндөгү патологиялык материалдан шарп ылаңынын вирусу лабораториялык диагностика жүргүзүү жана идентификациялоо үчүн А№17 (Кыргызстан-2021) деген наам берилген жаңы штамм бөлүнүп алынды. Ошондой эле О₁ (Тайвань) штаммына бир кыйла окшош дагы бир жаңы штамм бөлүнгөн. Бул изилденип жаткан изоляттар буга чейин бөлүнүп алынган диагностикалык өндүрүш каражаттары жана спецификалык профилактика үчүн колдонулган шарп вирусунун бардык штаммдарынан олуттуу айырмаланып тургандыктан, штаммдар бир жолку пассирлөө жолу менен бодо мал аркалуу жаңыртылып, андан соң ВНК-21 суспензия клетка культуранына жана ПСГК-30 монокатмарлуу клетка культуранына жайгаштырылды, инактивация режими каралып ошондой эле вакциналарды өндүрүү үчүн өнөр жайлык масштабда вирусту культивирлөө процесси оптималдаштырылды жана сезгич жаныбарлар үчүн анын натыйжалуулугу текшерилди.

Негизги сөздөр: вирус, штамм, шарп, культивирлөө, бодо мал, изолят, вакцина, клетка культураны.

Из патологического материала в виде эпителия афт крупно рогатого скота и овец был выделен штамм вируса ящура для проведения лабораторной диагностики и идентификации, который получил название А№17 (Кыргызстан-2021) и выделен штамм идентичный штамму О₁ (Тайвань). Так как, исследуемые изоляты существенно отличались от всех выделенных ранее штаммов вируса для производства средств диагностики и специфической профилактики. Было проведено освежение штаммов путем однократного пассирования на крупном рогатом скоте и после чего были адаптированы к суспензионной культуре клеток ВНК-21 и к монослойной культуре клеток ПСГК-30 а также, были изучены влияние режима инактивации, провели оптимизацию процесса культивирования вируса в промышленном масштабе для изготовления вакцин и испытали ее эффективность для восприимчивых животных.

Ключевые слова: вирус, штамм, ящур, культивирование, крупно рогатый скот, изолят, вакцина, культура клеток.

From pathological material in the form of aphthae epithelium of cattle and sheep, a strain of foot and mouth disease virus was isolated for laboratory diagnosis and identification, which was named А№17 (Kyrgyzstan-2021) and a strain identical to strain О₁ (Taiwan) was isolated. Since the studied isolates differed significantly from all previously isolated strains of the virus for the production of diagnostics and specific prophylaxis. The strains were refreshed by a single passage on cattle and then adapted to the suspension culture of ВНК-21 cells and to the monolayer cell culture of PSGK-30, as well as the effect of the inactivation mode was studied, the process of culturing the virus on an industrial scale was optimized for the manufacture vaccines and tested its efficacy in susceptible animals.

Key words: virus, strain, foot and mouth disease, isolate, cultivation, cattle, vaccine, cell culture

Ящур – остро протекающая высококонтагиозная вирусная болезнь домашних и диких парнокопытных животных, характеризующаяся лихорадкой и афтозными поражениями слизистой оболочки ротовой полости, бесшерстных участков кожи головы, вымени, копытного венчика, межкопытцевой щели и сопровождающаяся нарушением движения; у молодых животных – поражением миокарда и скелетных мышц [5;1].

Впервые заболевание описано в Италии С.Фракасториус в 1546 г. Вирусная этиология была установлена Леффлером и Фрошем (1897-1900), а также Хеккеро в 1899 г. и до сих пор остается одной из наиболее часто встречающихся везикулярных болезней парнокопытных животных, наносящих урон экономике государств и требующей значительных затрат, направленных на предупреждение и ликвидацию последствий вспышек инфекции. Несмотря на принятый «План поэтапной борьбы с ящуром», разработанный Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (ФАО) и Европейской комиссией по борьбе с ящуром (EuFMD), болезнь продолжает регистрироваться во многих странах мира [4].

В начале XX в. французские, немецкие и английские ученые установили множественность типов возбудителя, что имело большое практическое значение в разработке средств диагностики и профилактики болезни.

Возбудителем ящура является мелкий РНК-содержащий вирус – *Dermaphilus pecoris*, принадлежит к роду Rhinovirus, семьи Picornaviridae. Это один из самых мелких по размерам вирусов, содержит РНК. Его размеры составляют от 27 до 30 нм. Вирус ящура относится к группе наиболее простых вирусов. Он не разрушается эфиром из-за отсутствия липидов, не имеет мембраны и состоит из наружной белковой оболочки и центрального ядра – простой цепочки рибонуклеиновой кислоты (РНК) [2].

Целью экспериментальной работы было адаптировать штаммы А№17 (Кыргызстан-2021) и О₁ (Тайвань) к суспензионной культуре клеток ВНК-21 и к монослойной культуре клеток ПСГК-30.

Оптимизировать процесс культивирования вируса в промышленном масштабе, изготовить вакцину и испытать ее эффективность для восприимчивых животных.

Материалы и методы. Штаммы вируса ящура. Экспериментальную работу проводили с использованием следующих типов и штаммов вируса ящура:

- культуральный вирус ящура О₁№194, О₁ (Тайвань), А₂₂№550, А№17 (Кыргызстан 2021), репродуцированные в суспензии клеток ВНК-21, 5-6 пассажей каждый.

При проверке активности вакцин на морских свинках использовали адаптированные к ним штаммы вируса О₁№194, А₂₂№550.

При проверке активности вакцин на овец использовали адаптированные к овцам вирусы О₁№194, А₂₂№550, А№17 (Кыргызстан - 2021), О₁ (Тайвань).

Подопытные животные. В опытах использовали следующих животных:

- морских свинок, массой 450-500 г для контроля иммуногенности вакцин;

- КРС не моложе 18 месяцев, массой не менее 250 кг из благополучных по ящуру зон страны, где в течении последних двух лет не проводили вакцинацию против ящура;

- овец местной породы, массой 30-50 кг из благополучных по ящуру зон.

Приготовление суспензий вирусосодержащего материала. Суспензию клеток после замены ростовой среды заражали посевным вирусом из расчета 0,5-0,001 ТЦД₅₀ на клетку. Время инкубации составляло 10-19 часов. При гибели 90-95% клеток в рубашку культиватора подавали хладогент и охлаждали суспензию до 4-6°C.

Очистка вирусосодержащих суспензий. Вирусосодержащую суспензию культурального вируса очищали с помощью МЦ в конечной концентрации

0,007-0,02% с добавлением 0,2% хлороформа и эту смесь отстаивали для седиментации флукулированных белков в течении 24-48 часов. Надосадочную жидкость использовали в работе.

Концентрирование вируса и антигена. Концентрирование антигена осуществляли сорбцией на аэросиле, ГОА, полиэтиленгликолем и ультрафильтрацией.

Результаты полученных исследований. В августе 2021 года патологический материал в виде эпителия афт КРС, полученный из хозяйств Панфиловского района, Чуйской области, поступил в лабораторию ЗАО «Алтын-Тамыр» для проведения лабораторной диагностики и идентификации выделенного возбудителя.

Из доставленного в ЗАО «Алтын-Тамыр» патологического материала был выделен штамм вируса ящура, получивший название А№17 (Кыргызстан-2021). Методом прямого секвенирования в ПЦР первичной структуры гена и белка VP1 было установлено, что исследуемый изолят существенно отличается от всех выделенных ранее штаммов вируса, в том числе и от вируса А₂₂, используемого в настоящее время в Кыргызской Республике и других странах СНГ для производства средств диагностики и специфической профилактики [3].

В связи с этим необходимо было адаптировать штамм к суспензионной культуре клеток ВНК-21, оптимизировать процесс культивирования вируса в промышленном масштабе, изучить влияние режима инактивации, очистки на иммунизирующий антиген, изготовить вакцину и испытать ее эффективность для восприимчивых животных. Вирус был освежен путем однократного пассирования на КРС, после чего был адаптирован к перевиваемым клеткам ПСГК и ВНК-21. Результаты адаптации представлены в таблице 1.

Таблица 1

Биологические свойства вируса ящура штамма А№17 «Кыргызстан-2021»

| Система репродукции вируса | Время культивирования (ч) | Кол-во адаптивных пассажей | Титр инфекционности IgТЦД ₅₀ /мл | Вирусный белок | |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---|-----------------------|----------------|
| | | | | ОВБ мгк/мл | 146+75S мгк/мл |
| ПСГК-30 | 19,0 | 2 | 7,25 | 0,23 | - |
| | 19,0 | 3 | 8,25 | 0,33 | - |
| | 19,0 | 4 | 7,25 | 0,43 | - |
| | 19,0 | 5 | 7,5 | 0,4 | - |
| M±m | 19±0 | | 7,56±0,237 p≤0,001 | 0,35±0,044 p≤0,005 | |
| ВНК-21 суспензионная КС-40 | 16 | 1 | 7,25 | 2,3 | 1,61 |
| | 16,5 | 1 | 8,0 | 2,6 | 1,82 |
| | 17,0 | 1 | 7,75 | 2,5 | 1,75 |

НАУКА, НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ИННОВАЦИИ КЫРГЫЗСТАНА, № 3, 2022

| | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 16,0 | 1 | 8,0 | - | - |
| | 16,0 | 1 | 8,0 | - | - |
| | 16,0 | 1 | 8,0 | - | - |
| M±m | 16,25±0,196 p≤0,001 | - | 7,83±0,12 p≤0,001 | 2,46±0,09 p≤0,005 | 1,72±0,05 p≤0,001 |
| ВНК-21 суспензион-ная КМ-2000 | 17,5 | 2 | 7,5 | 2,24 | 1,21 |
| | 17,5 | 2 | 8,0 | 2,29 | 1,33 |
| | 16 | 2 | 7,75 | 3,3 | 2,20 |
| M±m | 17,0±0,5 p≤0,001 | - | 7,75±0,14 p≤0,001 | 2,61±0,34 p≤0,025 | 1,58±0,31 p≤0,05 |

В суспензионной культуре клеток ВНК-21 в реакторах КМ-2000 за 17 часов культивирования получали 2,61 мкг/мл общего вирусного белка, в том числе 1,58 мкг/мл 146+75S компонентов, что экономически оправдывало получение эффективной вакцины.

В Сокулукском районе в апреле 2004 г. Диагностировали ящур среди овец. Из доставленного в ЗАО «Алтын-Тамыр» патологического материала был выделен штамм вируса ящура, идентичный штамму O₁

(Тайвань). Проведенные исследования в лаборатории показали что O₁ (Тайвань) значительно отличается по иммунобиологическим свойствам от производственного штамма O₁ №194.

Штамм был освежен на крупном рогатом скоте и адаптирован к монослойной культуре клеток ПСГК-30, затем к суспензионной культуре клеток ВНК-21. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Биологические свойства вируса ящура штамма O₁ Тайвань

| Система репродукции вируса | Время культивирования (ч) | Кол-во адаптационных пассажей | Титр инфекционности lgТЦД50 /мл | Вирусный белок | |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | | ОВБ | 146+75S |
| ПСГК-30 | 24 | 1 | 7,0 | 0,95 | 0,54 |
| | 20 | 2 | 7,25 | 0,6 | |
| | 16,5 | 3 | 7,5 | 0,62 | |
| | 16,5 | 4 | 6,25 | 0,57 | |
| | 16,5 | 5 | 7,25 | 0,71 | |
| M±m | 18,7±1,488 p≤0,001 | - | 7,05±1,504 p≤0,010 | 0,69±0,069 p≤0,001 | - |
| ВНК-21 суспензионная КС-40 | 24 | 1 | 7,0; | 0,78 | 0,27 |
| | 17,5 | 1 | 7,5 | 1,1 | 0,46 |
| | 17,5 | 1 | 7,5 | 1,23 | 0,51 |
| | 15,5 | 1 | 7,75 | 1,95 | 1,65 |
| | 16,5 | 1 | 7,5 | 1,27 | 0,42 |
| | 17,0 | 1 | 7,75 | 2,07 | 1,62 |
| M±m | 17,9±1,261 p≤0,001 | - | 7,5±0,112 p≤0,001 | 1,4±0,206 p≤0,005 | 0,82±0,253 p≤0,025 |
| ВНК-21 суспензион-ная КМ-2000 | 10,5 | 2 | 6,75 | 0,87 | 0,63 |
| | 7,0 | 2 | 7,0 | 1,0 | 0,42 |
| | 8,0 | 2 | 7,25 | 2,47 | 0,73 |
| | 7,0 | 2 | 7,5 | 1,51 | 0,62 |

| | | | | | |
|-----|---------------------|--|----------------------|---------------------|--------------------|
| M±m | 8,1±0,82 p≤0,005 | | 7,12±0,84 p≤0,001 | 1,46±0,36 p≤0,05 | 0,6±0,06 p≤0,05 |
|-----|---------------------|--|----------------------|---------------------|--------------------|

Данные таблицы 2 показывают, что вирус адаптировали к культуре клеток ПСГК-30 в течении 3 последовательных пассажей. При культивировании в суспензий в аппаратах КС-40, где в качестве посевного вируса был вирус, полученный на монослое клеток ПСГК-30, выход 146+75S компонента составил 58,6%.

Культивирование вируса в промышленных масштабах КМ-2000 показывало, что в тех случаях, когда посевным материалом служил вирус, полученный в суспензии клеток ВНК-21, то выход 146+75S компонента достигал 41%. В то же время для приготовления качественных вакцин необходимо иметь сырье с содержанием не менее 1мкг/мл 146+75S компонентов.

Литература:

1. Bachrach H. L. Foot-and-mouth disease / H. L. Bachrach // *Rev Microbiol.* Bachrach H. L. Foot-and-mouth disease virus: immunogenicity and struc-Clinical manifestations of foot-and-mouth disease during the 2010/2011 epidemic in the Republic of Korea/ Yoon H., Yoon S., Wee S. et al.//*Transbound Emerg. Dis.*, 2012, 59 (6), 517-525.
2. Беспалов И. М. Ящур и меры борьбы с ним. – Ф.: Кыргызстан, 1980. – 56 с., ил.
3. Захаров, В.М. Искоренение ящура- один из элементов экологической безопасности ведения животноводства / В.М. Захаров, А.И. Дудников, В.А. Мищенко // *Проблемы экологической безопасности агропромышленного комплекса.* – Сергиев Посад, 1998. – Вып. 3. – С. 106-109.
4. Сидоровская М. В., Фомина С. Н., Кременчугская С. Р. Анализ вспышек ящура серотипов SAT-1, -2, -3 на территории Африканского континента за 2017–2019 гг. *Ветеринария сегодня.* 2021; 2 (37): 113–120. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-2-37-113-120.
5. Тальман Г. Ящур / Г. Тальман, А. Неклер, П. Фельфе.- Владимир, Щербаков А. В. Разработка ПЦР в реальном времени для обнаружения и количественного определения вируса ящура. / А.В. Щербаков, А.М. Тимина, Н.А. Первозчикова // *Российский ветеринарный журнал. Спец. вып.* - 2008. - С. 26-27.
6. Нургазиев Р.З., Кошематов Ж.К., Крутская Е.Д., Абдыкеримов К.А., Джапаралиев Н.Т., Ахмеджанов М. Дифференциальная диагностика заболеваний среди мелких жвачных животных на территории Кыргызской Республики. / *Известия ВУЗов Кыргызстана.* 2015. №. 7. С. 52-54