

DOI:10.26104/NNTIK.2023.25.13.008

Аубакир Н.А., Кармышова У.Ж., Рыстаева Р.А., Тулендибаев А.Б., Орынбаев М.Б.

АТТЕНУИРЛЕНГЕН МАЛДЫН НОДУЛЯРДЫК ДЕРМАТИТ ВИРУСУНУН
«NEETHLING-RIBSP/C7» КЛОНУНУН ЗЫЯНСЫЗДЫГЫ

Аубакир Н.А., Кармышова У.Ж., Рыстаева Р.А., Тулендибаев А.Б., Орынбаев М.Б.

БЕЗВРЕДНОСТЬ КЛОНА «NEETHLING-RIBSP/C7» АТТЕНУИРОВАННОГО ВИРУСА
НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

N. Aubakir, U. Karmyshova, R. Rystaeva, A. Tulendibayev, M. Orynbaev

SAFETY OF THE NEETHLING-RIBSP/C7 CLONE OF ATTENUATED
CATTLE LODULAR DERMATITIS VIRUS

УДК: 576.858.75

Бул изилдөөнүн максаты тери оорусунун "Neethling-RIBSP" аттенуацияланган штаммынын зыянсыз клонун алуу болгон. Бул максатка жетүү үчүн "Neethling-RIBSP" аттенуацияланган штамм чектүү суюлтуу ыкмасы менен клондолгон. Клондорду кийинки тандоодо кесек (бляшка) пайда болуу реакциясы колдонулат. Клондоштуруунун натыйжасында "Neethling-RIBSP" штаммынын 9 клону, нодулярдык дерматит вирусун алынды. Нодулярдык тери оорусунун вирусунун "Neethling-RIBSP" штаммынын клондорунун өсүү мүнөздөмөлөрү козулардын уругунун (KV) культура клеткаларын инфицириялоо жолу менен аныкталган. Изилдөөлөр көрсөткөндөй, алынган 9 клондун ичинен төртөө гана ачык культуралык касиеттерге ээ жана 5,5-6,0 lg TCID₅₀/см³ титрде TU клетка культуранында топтолгон. Калган 5 клон TU клетка культуранында начар репликацияланган. Аттенуацияланган Neethling-RIBSP штаммынын эң аз арактогендик клонун аныктоо үчүн жаныбарлар ар бир клон менен тери ичине 10⁻¹ ден 10⁻⁶ га чейинки суюлтууларда жана 5 жаныбарга талаа дозада тери астына вакцинацияланган. Изилдөөлөр көрсөткөндөй, Neethling-RIBSP/C7 клонун тери астына жана териге киргизүүдө эксперименттик жаныбарлар клиникалык жактан дени сак бойдон калган, эксперименттик жаныбарлардын дене температурасы физиологиялык нормада болгон жана инъекция болгон жерде жергиликтүү реакциялар байкалган эмес.

Негизги сөздөр: вирус, клон, нодулярдык тери оорусу, зыянсыздык, эмдөө, бодо мал.

Целью настоящих исследований являлось получение безвредного клона аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита. Для достижения поставленной цели было проведено клонирование аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» методом предельных разведений. При последующем отборе клонов использовали реакцию бляшкообразования. В результате клонирования получили 9 клонов штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита. Ростовые характеристики клонов штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита определяли путем инфицирования клеток культуры тестиккулы ягнят (ТЯ). Исследования показали, что из полученных 9 клонов только 4 обладали выраженными культуральными свойствами и накапливались в культуре клеток ТЯ в титрах 5,5-6,0 lg TCID₅₀/см³. Остальные 5 клонов плохо реплицировались в культуре клеток ТЯ. Для определения наименее арактогенного клона аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» каждым клоном вакцинировали животных внутрикожно в разведениях с 10⁻¹ по 10⁻⁶ и по 5 животных подкожно в полевой дозе. Проведенными исследованиями было показано, что как при подкожном так при внутрикожном введении клон Neethling-RIBSP/C7 опытные живот-

ные оставались клинически здоровыми, температура тела опытных животных была в пределах физиологической нормы, на месте введения вакцины местных реакций отмечено не было.

Ключевые слова: вирус, клон, нодулярный дерматит, безвредность, вакцинация, крупно рогатый скот.

The aim of this study was to obtain a harmless clone of the attenuated strain "Neethling-RIBSP" lumpy skin disease virus. To achieve this goal, the attenuated strain "Neethling-RIBSP" was cloned by the method of limiting dilutions. In the subsequent selection of clones used the reaction of plaque formation. As a result of cloning, 9 clones of the "Neethling-RIBSP" strain of Lumpy Dermatitis Virus were obtained. Growth characteristics of clones of the "Neethling-RIBSP" strain of lumpy skin disease virus were determined by infecting the cells of the culture of the testicular lambs (TU). Studies have shown that out of 9 clones obtained, only 4 had pronounced cultural properties and accumulated in TU cell culture in titers of 5.5-6.0 lg TCID₅₀/cm³. The remaining 5 clones replicated poorly in TU cell culture. To determine the least areactogenic clone of the attenuated Neethling-RIBSP strain, animals were vaccinated with each clone intradermally in dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁶ and 5 animals subcutaneously in a field dose. Studies have shown that both with subcutaneous and intradermal administration of the Neethling-RIBSP/C7 clone, the experimental animals remained clinically healthy, the body temperature of the experimental animals was within the physiological norm, and no local reactions were noted at the injection site.

Key words: virus, clone, lumpy skin disease, harmlessness, vaccination, cattle.

Введение. Нодулярный дерматит является высоко контагиозной, трансграничной болезнью крупного рогатого скота, для которой характерны лихорадка, лимфаденит, образование узелков на коже, слизистых оболочках и внутренних органах. Развитие узелков разного размера начинается после начала лихорадки, их количество может варьироваться от нескольких узелков до обобщенной формы, обхватывающей всё тело [1]. Нодулярный дерматит вызывается двухцепочным ДНК-вирусом рода Capripoxvirus семейства Poxviridae, который антигенно тесно связан с поксвирусом овец и коз [2].

Передача болезни происходит преимущественно через насекомых, через механических переносчиков, зараженный корм и воду, инфицированную слюну и, реже, при естественном контакте. Роль различных

членистоногих-переносчиков, вероятно, будет различаться в разных районах в зависимости от численности и пищевого поведения переносчика. Кровососущие насекомые являются естественным резервуаром для вируса нодулярного дерматита [4, 5]. Впервые НД был зарегистрирован в 1929 году в Восточной Африке, в Замбии [3]. Долгое время распространение нодулярного дерматита наблюдалось в большинстве стран Африканского континента, однако, в течение последних десятилетий он медленно вторгся на новые территории, проникая сначала на Ближний Восток и в Турцию, а с 2015 г. в большинстве балканских стран, на Кавказ и в Российскую Федерацию, где болезнь продолжает распространяться несмотря на принятые усилия по профилактике и контролю [4]. Впервые в Республике Казахстан нодулярный дерматит был зарегистрирован в 2016 году.

Согласно данным МЭБ, импорт животных и животноводческой продукции из неблагополучных стран может подвергать страну-импортёра определенному риску заноса заболевания [3].

При нодулярном дерматите крупного рогатого скота значительно уменьшается удой молока, повреждается шкура животного, а также болезнь приводит к вынужденному убою скота и гибели, что наносит огромный экономический ущерб сельскому хозяйству [5].

Для успешного контроля нодулярного дерматита, вакцинация всех восприимчивых животных считается основной опорой, поддерживаемой другими мерами контроля, такими как искоренение, ограничения на передвижение животных и борьба с переносчиками [6]. На данный момент каких либо эффективных мероприятий по терапии НД не существует, соответственно вакцинопрофилактика является наиболее важным средством предупреждения болезни и снижения потерь от заболеваемости [7]. В связи с этим в мире для профилактики против НД используют ряд живых вакцин, изготовленных из гомологичных и гетерологичных штаммов [8]. Известны штаммы вируса НД аттенуированные путем длительных, перемежающихся пассажей в чувствительных системах культивирования, используемые в качестве лицензионных вакцин против нодулярного дерматита: штамм Neethling-LSD vaccine-OBP, штамм Neethling-Herbivac vaccine, штамм SIS-Lumpyvax vaccine [9]. Все перечисленные вакцины вызывают поствакцинальные осложнения с клиническим проявлением болезни у вакцинированных животных, такие как уплотнения различных размеров на месте введения вакцины, кратковременным повышением температуры тела, снижением удоев и привесов, а также в некоторых случаях проявлялось образование уплотнений по всему телу [8].

В 2018 г сотрудниками НИИПББ путем многократных последовательных и перемежающихся пассажей эпизоотического вируса «Dermatitis nodula-

res/2016/Atyrau/KZ», выделенного из патологического материала от животных, павших в 2016 г. от нодулярного дерматита в Атырауской области, на перевиваемых и первично-трипсинизированных культурах клеток, а также развивающихся куриных эмбрионах был получен аттенуированный штамм Neethling-RIBSP [2]. Исследования показали, что данный штамм, как и все существующие в настоящее время вакцинные штаммы вызывает поствакцинальные осложнения до 10% вакцинированных животных. Осложнения проявляются образованием уплотнений различных размеров на месте введения вакцины, кратковременным повышением температуры тела.

Целью настоящих исследований являлось получение безвредного клона из аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита.

Материалы и методы. Работа выполнялась на базе Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности. Использованы вирусологические, серологические, молекулярно-генетические методы исследования.

Объектом исследования является вирус нодулярного дерматита, штамм типа Neethling.

Вирусы. В работе использовали аттенуированный штамм «Neethling-RIBSP» вируса НД. Вирус получен из коллекции микроорганизмов РГП НИИПББ КН МОН РК.

Клонирование вируса нодулярного дерматита КРС. Для клонирования использовали культуру клеток ТЯ в 6-луночных планшетах. Готовили разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-5} . Клетки ТЯ инфицировали каждым разведением в объеме 0,2 мл. Инкубировали 60 мин при температуре 37 °С, затем удаляли вирусосодержащую среду и осторожно вносили 3 мл 0,5% раствора агарозы, приготовленного на питательной среде. После застывания агарозы планшеты переносили в инкубатор. Через 5-7 сут клетки окрашивали нейтральным красным. Готовили 0,03% раствор нейтрального красного в PBS. В каждую лунку вносили 1 мл раствора красителя и инкубировали 2-3 ч при температуре 37°С. По истечении времени инкубации удаляли жидкость из лунок. Нейтральный красный окрашивает только живые клетки. Единичные бляшки переносили в свежую культуру клеток для накопления вирусной массы.

Культивирование вируса в культуре клеток. Монослойную культуру заражали с адсорбцией вируса на клетках в течение 1 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, с последующим внесением поддерживающей среды с добавлением 2% фетальной сыворотки крови КРС и 1% глутамина. Зараженный монослой инкубировали при 37°C $(+0,5)$, микроскопировали на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TS 100 - ежедневно и смену среды осуществляли по мере необходимости. Сбор вируса проводили при проявлении цитопатического

действия (ЦПД) на 80-90% площади монослоя. Полученный вирус хранили при температуре минус $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Титрование вируса на культуре клеток. Биологическую активность полученных клонов вируса НД КРС штамма «Neethling-RIBSP» определяли титрованием на 96-луночной планшете (ТРР) с 1-2 суточным монослоем культуры клеток ТЯ. Каждое разведение вируса повторяли 4-кратно, с учетом наличия контрольных и бессменных лунок. Инкубировали при $37 (\pm 0,5)^\circ\text{C}$ в микроаэрофильных условиях с содержанием 5% CO_2 . Смену среды производили по мере необходимости, начиная с 3 суток от начала испытания, не касаясь дна, с помощью стерильных наконечников с аэрозольным барьером. Ежедневно микроскопировали в инвертированном микроскопе до 10 суток, после чего производили окончательный учет результатов. Учет результатов титрования проводят на 12 сутки по наличию цитопатических изменений в зараженных лунках и при отсутствии таковых в контрольных культурах. Титр вируса рассчитывают по Риду и Менчу.

Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации проводили на 1-2-суточном монослое культуры клеток тестикул ягненка (ТЯ) в пробирках. Для этого готовили среду ПСП с 2% содержанием фетальной сыворотки КРС. Затем готовили разведения исследуемых сывороток от 1:2, инактивировали ее при 56°C 30 минут, после чего проводили разведения до 1:32. Далее готовили рабочие разведения вируса для контакта с сыворотками. По 0,2 мл смеси каждого разведения сыворотки и двойного рабочего разведения вируса после контакта вносили в четыре пробирки, в которых находится монослой культуры клеток. Для адсорбции вируса на клетки монослоя инфицированные пробирки выдерживают в термостате при 37°C 35-40 минут. Затем в каждую пробирку заливали по 0,8 мл поддерживающей среды. Контролем являются интактные пробирки с культурой клеток. Клеточные культуры инкубировали при 37°C в течение 10 дней. Результаты оценивали за наличием или отсутствием цитопатического действия вируса. Смену среды проводят с интервалом 2 суток, вне зависимости от pH. Учет осуществляют по индексу нейтрализации

Определение безопасности на КРС. Безопасность клонов вируса НД КРС штамма «Neethling-RIBSP» испытывали на 20 серонегативных к капрпоксвирусам КРС разных возрастов казахской белой породы. Для определения наименее ареактогенного клона аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» было проведено два вида опытов на животных. Так каждым клоном вакцинировали по одному животному внутрикожно в разведениях с 10^{-1} по 10^{-6} и по 5 животных подкожно в среднюю треть шеи в полевой дозе. После введения вакцины за испытуемыми

животными вели клиническое наблюдение в течение 30 суток. У животных два раза в день измеряли температуру тела, оценивали местную реакцию после введения вируса, а также наблюдали за общим состоянием животных на наличие клинических признаков заболеваний.

Биоэтика. Исследования проводились в соответствии с протоколом. За животными ухаживал персонал, имеющий ветеринарное образование и большой практический опыт в экспериментальных работах. Животные по окончании опытов были подвержены эвтаназии, методами соответствующими принципам, установленным Рекомендациями Европейской комиссии по эвтаназии экспериментальных животных (1 и 2 ч.). После подтверждения биологической смерти проводилось вскрытие с ревизией внутренних органов, с отбором проб биоматериала и утилизацией туши в проходном автоклаве при 1,5 атм. в течение 2 часов и вывозом туш в яму Беккери.

Результаты, клонирование вируса нодулярного дерматита КРС. Для достижения поставленной цели было проведено клонирование аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» методом предельных разведений. При последующем отборе клонов использовали реакцию бляшкообразования, после чего изучали культуральные свойства, безвредность на животных и проводили секвенирование генома вируса.

В результате клонирования мы получили 9 клонов штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита. Ростовые характеристики клонов штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита определяли путем инфицирования клеток культуры тестикул ягнят (ТЯ). Исследования показали, что из полученных 9 клонов только 4 обладали выраженными культуральными свойствами и накапливались в культуре клеток ТЯ в титрах $5,5-6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Остальные 5 клонов плохо реплицировались в культуре клеток ТЯ. Клоны Neethling-RIBSP/C1, Neethling-RIBSP/C4, Neethling-RIBSP/C5, Neethling-RIBSP/C7 были выбраны для дальнейших исследований безвредности на животных.

Изучение безвредности аттенуированных клонов штамма «Neethling-RIBSP». До начала эксперимента у всех животных были отобраны пробы и проверены на наличие вируса НД и антител к нему в реакции нейтрализации. В результате постановки реакции нейтрализации не было выявлено вируснейтрализующих антител.

Для определения наименее ареактогенного клон аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» каждым клоном вакцинировали по одному животному внутрикожно в разведениях с 10^{-1} по 10^{-6} и по 5 животных подкожно в полевой дозе (рисунок 1). После введения клонов за испытуемыми животными вели клиническое наблюдение в течение 30 суток. У жи-

вотных два раза в день измеряли температуру тела, оценивали местную реакцию после введения вируса,

а также наблюдали за общим состоянием животных на наличие клинических признаков заболеваний.

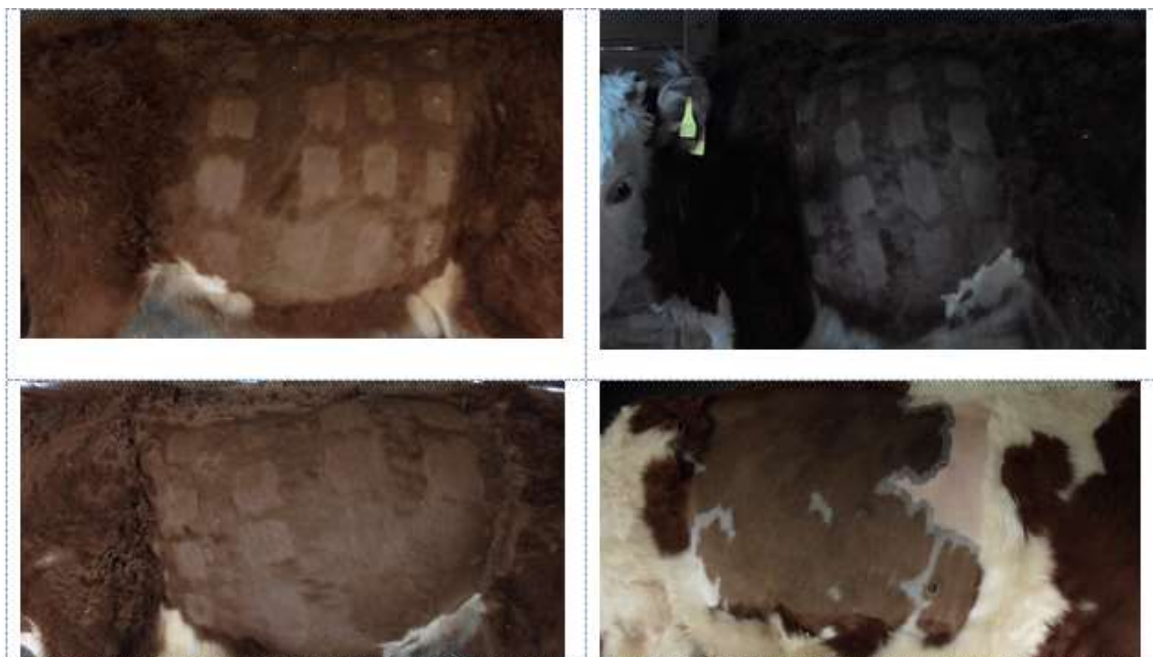


Рис. 1. Животные инъецированные подкожно в разведениях с 10^{-1} по 10^{-6}

В течение всего срока наблюдения все привитые животные оставались клинически здоровыми. Повышение температуры тела или каких-либо других клинических признаков болезни у привитых животных выявлено не было. Проведенными исследованиями было показано, что как при подкожном так при внутрикожном введении клона Neethling-RIBSP/C7 опытные животные оставались клинически здоровыми, температура тела опытных животных была в пределах

физиологической нормы, аппетит и поведение сохранены (рисунок 2), на месте введения вакцины местных реакций отмечено не было. Остальные три клон при их подкожном и внутрикожном введении вызывали у подопытных животных образование припухлостей на месте введения размером до 20 см, а также кратковременное повышение температуры тела, припухлостей на месте введения рассосались на 16-17 день.

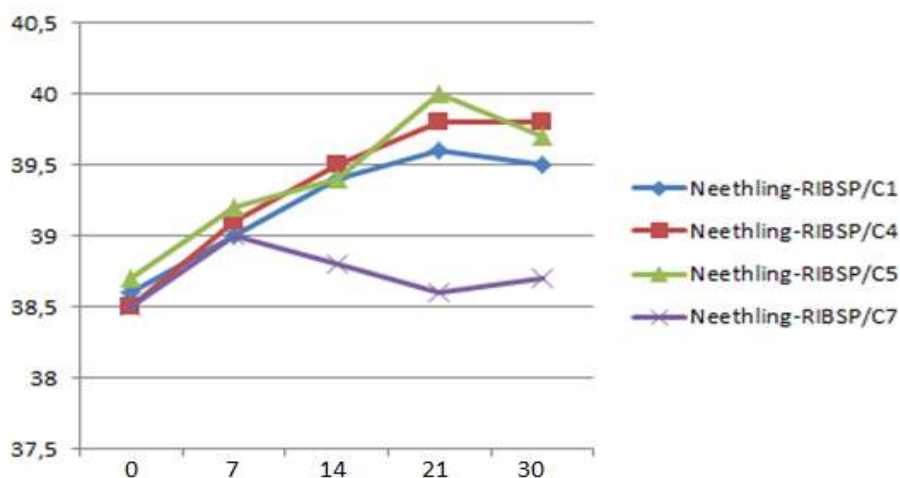


Рис. 2. Температурная реакция КРС на введения различных клонов аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP»

На 30 сутки после введения вакцины было проведено заключительное обследование животных. Установлено, что все животные клинически здоровы и отклонений от физиологической нормы не выявлено.

В результате проведенных исследований полученных клонов из аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» методом предельных разведений, клон Neethling-RIBSP/C7 полностью безвредный и пригодный для специфической профилактики нодулярного дерматита КРС.

Обсуждение. В ближайшие десятилетия будет непрерывно возрастать удельный вес вакцинопрофилактики в рамках реализации политики – достижение здоровья для всех.

Существующие в мире вакцины для профилактики НД, в основном, представлены из живых гомологичного и гетерологичных штаммов. Из-за близкого генетического родства, есть данные о применении гетерологичных вакцинных штаммов для профилактики НД КРС. Тем не менее, данные о последних вспышках показывают, что применение гетерологичных вакцинных штаммов в борьбе с НД, мера не вполне оправданная.

Поэтому, несмотря на существующие в мире вакцины и усилия в области ликвидации НД, вопрос поиска новых, более эффективных вакцин, которые возможно дифференцировать от дикого вируса, могут быть быстро разработаны и легко произведены в регионе – остается открытым.

Бесспорно, живые аттенуированные вакцины являются наиболее успешными, за счет репликации вакцинного штамма в макроорганизме, что обеспечивает большую вероятность запуска клеточного и гуморального звеньев. Но, к сожалению, контакт с ослабленной иммунной системой, изредка, может приводить к реактивации вирулентных свойств вакцинного штамма, поэтому важность изучения реверсидельных свойств на протяжении нескольких пассажей – высока. Исследование показало, что аттенуированный вирус не передается от иммунизированного животного и не выделяется в окружающую среду.

Полученные данные свидетельствуют о том, что штамм «Neethling-RIBSP/C7» вируса НД КРС, полученный путем клонирования безвреден для животных, вызывает выработку вируснейтрализующих антител, не выделяясь при этом в окружающую среду с экскретами иммунизированного животного, что показывает его аттенуированность.

Литература:

1. Milovanović, M., Dietze, K., Milićević, V. et al. Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests. *BMC Vet Res* 15, 80 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1831-y>
2. A. Gelagay, A. Yebeben, T. Tesfaye, N. Haileleul, G. Esayas. Lumpy Skin Disease: Preliminary vaccine efficacy assessment and overview on outbreak impact in dairy cattle at Debrezeit, central Ethiopia. *Antiviral research*. 2013. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.02.008.
3. Al-Salihi, Karima. Lumpy Skin disease: Review of literature. 2014. *Mirror res.vet.e-ISSN 2307-8073*. 3. 6-23.
4. Tuppurainen, E., Alexandrov, T. & Beltrán-Alcrudo, D. 2017. Lumpy skin disease field manual – A manual for veterinarians. *FAO Animal Production and Health Manual No. 20*. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 60 pages.
5. Lee, N.-H., Lee, J.-A., Park, S.-Y., Song, C.-S., Choi, I.-S. & Lee, J.-B. (2012). Обзор разработки и исследования вакцин для промышленных животных в Корее. Клинические и экспериментальные исследования вакцин, 1 (1), 18. <https://doi.org/10.7774/cevr.2012.1.1.18>
6. Babiuk, Shawn. (2018). Treatment of Lumpy Skin Disease. 10.1007/978-3-319-92411-3_17.
7. Нисанова Р.К., Копеев С.К., Рыстаева Р.А., Тулендибаев А.Б., Орынбаев М.Б. Испытание безвредности вакцины против нодулярного дерматита. *Известия, нәтижелер – Исследования и результаты Казахского национального аграрного университета*, № 4 (84), 2019, с.64-69. <https://izdenister.kaznau.kz/?rubr=101>
8. Kitching R. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev Biol (Basel)* 2003; 114:161–7
9. Mathijs E., Vandenbussche F., Haegeman A., Nthangeni B., Van Borm S. and De Clercq K. Complete Genome Sequences of the Neethling-like Lumpy Skin Disease Virus Strains from Three Commercial Live Attenuated Vaccines. // *Genome Announc.* – 2016. – Vol. 4(6): e01255-16. doi:10.1128/genome.A.01255-16