

Naqyar D.M., Rakhmanov S.S.

THE ALLELE POOL FEATURES ON DNA MICROSATELLITES OF THE BLACK AND
MOTLEY CATTLE BREED IN SOUTH EAST KAZAKHSTAN

Abstract

It describe the black and white freeze cattle breed genetically polymorphism, calculated frequency of alleles and the heterozygosis level for each locus. Generally receiving data required to evaluate the flock structure and genetic rocks.

Keywords: polymorphism, DNA-Analysis primers, cattle, database.

УДК 619:616.578.832.1

Шалгынбаев Э.К., Ильгекбаева Г.Д., Орынбаев М.Б.

Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»

КН МОН РК, Жамбылская обл., Кордайский р-н, пгт Гвардейский

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ
ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Аннотация

В работе представлены результаты исследований по выделению вируса ЧМЖЖ на культуре клеток и изучению культуральных свойств выделенного вируса. В результате проведенных исследований выделен эпизоотологически актуальный изолят «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ. Установлено, что наиболее приемлемой системой для культивирования изолята «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ является первично-трипсинизированная культура клеток ПЯ. Определены оптимальные условия культивирования выделенного вируса.

Ключевые слова: Вирус, чума мелких жвачных животных, изолят, культура клеток, почки ягненка.

Введение

Чума мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) (Peste des petits ruminants) – высококонтагиозная, остро или подостро протекающая вирусная болезнь овец и коз, характеризующаяся лихорадкой, язвенными поражениями слизистой оболочки ротовой полости, геморрагическим гастроэнтеритом, поражением лимфоидной системы и развитием пневмонии [1].

ЧМЖЖ относится к числу опасных заболеваний в последние годы нанося большой экономический ущерб животноводству стран СНГ и в том числе Республики Казахстан [2,3,4]. В системе мер борьбы с ЧМЖЖ в неблагополучных странах ключевая роль отводится вакцинации [4].

Для получения диагностических и профилактических препаратов большое значение имеет вирусосодержащее сырье с высокой биологической активностью.

Известно, что вирус ЧМЖЖ репродуцируется в различных клеточных системах, в том числе в первично трипсинизированных (почка ягненка, тестикул ягненка, почка козленка, тестикул козленка, эмбриональные клетки почки мелких жвачных, клетки кожи эмбриона овцы, клетки почек обезьян) и в перевиваемых (почка теленка (MDBK), почка сайгака (ПС), почка овцы (ПО), почка эмбриона свиньи (СПЭВ), почка свиньи (IB-RS-2), почка сирийского хомячка (ВНК-21), почка африканской зеленой мартышки (VERO) и др.) [5]. Для получения вирусосодержащего сырья с высокой биологической активностью необходимы не только наиболее чувствительная культура клеток, но и оптимальные условия культивирования.

Целью настоящей работы было выделение эпизоотически актуального штамма вируса ЧМЖЖ циркулирующих на территории Казахстана и изучение культуральных свойств выделенного вируса.

Материалы и методы

В работе были использован патологический материал от больных овец из крестьянского хозяйства «Бейбитшилик» с. Жылыбулак Беликульского сельского округа Жуалинского района Жамбылской области.

Выделение вируса проводили по общепринятой методике в первично-трипсинизированной культуре клеток почки ягненка (ПЯ).

Идентификацию выделенного вируса проводили методом ПЦР с использованием набора «Real-Time RT-PCR Target Specific Reagents For The Identification of Paste des Petits Ruminants Virus» (производства Tetracore), а также электронной микроскопией.

Для культивирования и титрования вируса ЧМЖЖ использовали первично-трипсинизированную культуру клеток ПЯ, а также перевиваемые культуры клеток почки овцы (ПО), почки зеленой мартышки (Vero) и почки быка MDBK. Поддерживающие среды, приготовленные по стандартным прописям ПСС, ПСП, Игла, раствор Хенкса с дрожжевым экстрактом и №199.

Культивирование вируса ЧМЖЖ проводили в стационарных условиях. Для этого разведенную вирусосодержащую суспензию вносили на предварительно отмытый от ростовой среды раствором Хенкса 2-3-суточный монослой с соответствующей культурой клеток, выращенный в пробирках и экспонировали в течение часа при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$, после чего вирус удаляли, монослой однократно отмывали и в пробирки с культурой клеток вносили по $1,0 \text{ см}^3$ поддерживающей среды. В дальнейшем инфицируемую культуру клеток просматривали под микроскопом перед сменой среды и ежедневно для оценки цитопатического действия (ЦПД) вируса. Смену среды проводили через каждые 2 суток. Инфицированную культуру инкубировали при 37°C , и при поражении площади монослоя не менее 70-80%, клетки 3-кратно промораживали, производили сбор вируса с последующим отбором проб для исключения микробной контаминации и определения инфекционной активности вируса титрованием в культуре клеток. Полученный материал снова замораживали и хранили при температуре минус 40°C до получения результатов контроля.

Биологическую активность определяли титрованием на соответствующей культуре клеток. Для этого вирусосодержащий материал титровали методом последовательных десятикратных разведений в трехкратной повторности. Зараженную и контрольную культуру клеток выдерживали при температуре 37°C с заменой питательной среды через каждые 2-3 суток. Результаты титрования учитывали по характерному поражению клеток монослоя в течение 14 суток Титр вируса рассчитывают по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в $\lg \text{ТЦЦ}50/\text{см}^3$.

Результаты и обсуждение

В июле 2014 г. в крестьянском хозяйстве «Бейбітшілік», с. Жылыбулак, с/о Беликульский Жуалинского района Жамбылской области произошло массовое заболевание

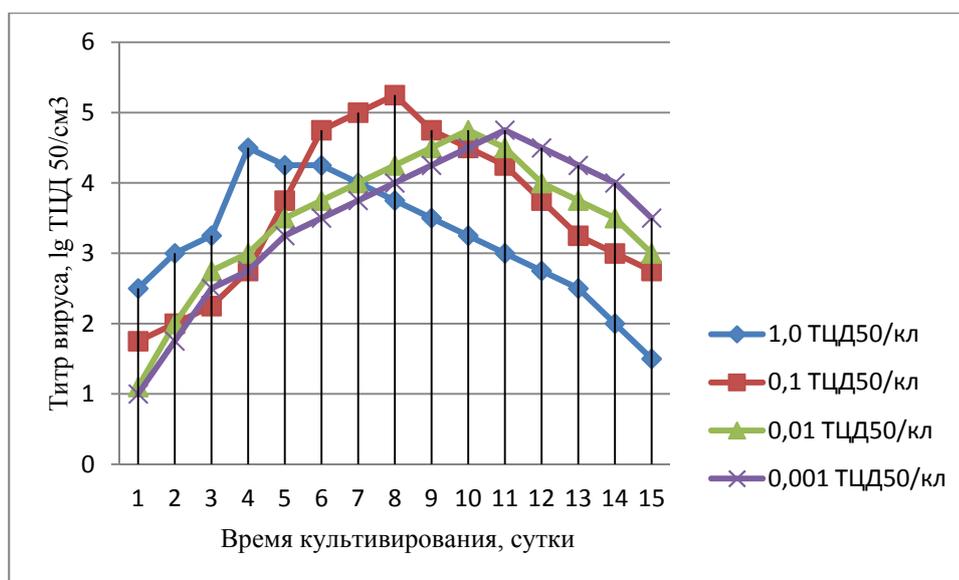
овец и коз. Исследование патологического материала в условиях НИИПББ показало, что заболевание животных вызвано вирусом ЧМЖЖ [4].

В настоящее время культуры клеток являются основной биологической системой для выращивания вирусов и определение наиболее чувствительных к вирусу клеточных систем необходимо для получения вирусосодержащего сырья с высокой биологической активностью для изготовления вакцинных и диагностических препаратов.

Для выделения вируса монослой клеток с культурой клеток ПЯ инфицировали 20% суспензией патологического материала от павших животных. Пробирки с зараженной культурой клеток культивировали при 37°C до проявления цитопатических изменений. В результате проведенных исследований на 1 пассажном уровне нами был выделен цитопатогенный агент в культурах клеток ПЯ. Выделенный вирус методом ПЦР был идентифицирован как вирус ЧМЖЖ. В результате электронно-микроскопических исследований в культуральных пробах был обнаружен вирус, который по морфологическим свойствам был идентифицирован как морбилливирус. Выделенный изолят обозначили как «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ. Секвенирование фрагмента N-гена показало, что вирус относится к 4 линии. Следует отметить, что вакцинный штамм используемый в Казахстане принадлежит к линии 2 и близок к вакцинным штаммом Нигерии 75/1. Таким образом, выделенный вирус эпизоотологически актуален и изучение его биологических свойств важно для разработки средств диагностики и профилактики заболевания.

В дальнейшем проводили изучение культуральных свойств выделенного вируса на культуре клеток ПЯ.

С целью определения накопления вируса ЧМЖЖ при разной множественности инфицирования монослойную культуру клеток ПЯ инфицировали вирусом в дозах 1,0; 0,1; 0,01 и 0,001 ТЦД₅₀/кл и инкубировали при 37°C со сменой среды через 2-3 суток. Через каждые сутки после инфицирования из групп отбирали пробы и определяли биологическую активность. Динамика накопления вируса ЧМЖЖ в зависимости от дозы заражения представлена на рисунке 1.



активность вируса в суспензии достигала 5,0-5,25 lg ТЦД₅₀/см³ с поражением 70-90% поверхности монослоя. При множественности заражения 1,0 ТЦД₅₀/кл накопление вируса шло быстрее, но активность при этом не превышала 4,5 lg ТЦД₅₀/см³, а при

множественности заражения 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл титр вируса достигал 4,50-4,75 lg ТЦД₅₀/см³, однако при этом увеличивалось время культивирования до 9-11 суток.

На следующем этапе нами были проведены исследований по определению зависимости репродукции выделенного вируса от вида сывороток в поддерживающей среде. Изучение накопления изолята «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ проводили с использованием различных видов сывороток крови: инактивированной фетальной (FS ин.) и не инактивированной фетальной (FS), инактивированной КРС (SKPC ин.) и не инактивированной КРС (S КРС), инактивированной ягненка (S ягненка ин), инактивированной лошади (S лошади ин.). Контролем служила среда без добавления сыворотки. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Зависимость репродукции изолята «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ от вида сыворотки в поддерживающей среде

Доза заражения (ТЦД ₅₀ /Кл)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)						
	Среда с добавлением 2% сыворотки крови						Среда без добавления сыворотки
	FS ин.	FS	SKPC ин.	SKPC	S ягненка ин.	S лошади ин.	
Среда ПСП							
0,1	5,25±0,25	3,45±0,23	5,50±0,14	3,0±0,08	4,75±0,16	4,65±0,23	3,75±0,11
0,01	5,0±0,11	3,27±0,22	5,45±0,25	3,25±0,28	5,0±0,15	4,35±0,61	3,07±0,17
0,001	4,75±0,13	3,19±0,18	5,37±0,23	3,13±0,34	5,0±0,25	4,0±0,21	2,51±0,09
Среда ПСС							
0,1	5,0±0,31	3,75±0,13	5,03±0,24	2,85±0,27	4,5±0,31	4,0±0,25	2,73±0,05
0,01	4,9±0,29	4,71±0,28	4,61±0,11	3,45±0,43	5,0±0,14	4,55±0,20	2,7±0,24
0,001	4,4±0,12	3,69±0,35	4,53±0,16	3,14±0,50	4,5±0,26	4,21±0,26	3,01±0,18

Как видно из таблицы 1, наибольшее накопление вируса отмечалось при использовании 2% инактивированной фетальной сыворотки и среды ПСП, а также дозы заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл., где титр составил 5,25±0,25 lg ТЦД₅₀/см³. Достаточно высокие титры вируса были и при использовании инактивированной фетальной сыворотки, среды ПСС и дозы заражения 0,1; 0,01 ТЦД₅₀/кл, а также при использовании питательной среды ПСП и дозы заражения 0,01; 0,001 ТЦД₅₀/кл, когда титр составлял от 4,75 до 5,00 lg ТЦД₅₀/см³. Внесение среды ПСП с добавлением инактивированной сыворотки КРС и множественностью заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл вызывало накопление вируса в титре 5,50±0,14 lg ТЦД₅₀/см³. Более низкий показатель накопления вируса отмечался при использовании сред без добавления сыворотки, а также не инактивированной сыворотки КРС. Установлено, что при использовании всех не инактивированных сывороток титр вируса был ниже на 1,0-2,0 lg ТЦД₅₀/см³.

Из вышеизложенного следует, что для получения вирусной суспензии с высокой биологической активностью возможно использование инактивированной фетальной сыворотки, а при наработке вируса для изготовления вакцин экономически целесообразно использовать в составе поддерживающих сред инактивированную сыворотку КРС.

Для оптимизации условий культивирования вируса изучали различные способы заражения культуры клеток. Для этого вносили вирус ЧМЖЖ в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл на полностью сформированный монослой перевиваемой культуры клеток ПЯ и в суспензию клеток. Данные этих исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние способа заражения культуры клеток на репродукцию изолята «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ

Способ заражения	Посевная концентрация клеток (тыс./см ³)	Количество пассажей вируса	Время культивирования (сутки)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)
На монослой клеток	350-400	1	9	3,50±0,23
		2	9	4,21±0,17
		3	7	4,25±0,25
		4	6	4,45±0,14
		5	5	5,21±0,27
В суспензию клеток	350-400	1	7	3,75±0,21
		2	6	4,24±0,17
		3	6	4,69±0,11
		4	6	4,73±0,55
		5	5	5,45±0,15

Из таблицы 2 следует, что при внесении вируса в суспензию клеток титр был в среднем на 0,25 lg ТЦД₅₀/см³ выше, чем при заражении на полностью сформированный монослой. При увеличении количества пассажей титр вируса повышался на 1,5-2,0 lg ТЦД₅₀/см³.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований выделен эпизоотологически актуальный для Казахстана изолят «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ. Определены оптимальные условия культивирования выделенного вируса. Установлено, что максимальное накопление изолята «ZHUALY KZ 2014» вируса ЧМЖЖ происходит при множественности заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл первичной культуры клеток ПЯ и инкубировании при 37⁰С в течении 6-8 суток. Для культивирования вируса оптимальной средой является среда ПСП с добавлением 2% инактивированной фетальной сыворотки. При внесении вируса в суспензию клеток титр в среднем на 0,25 lg ТЦД₅₀/см³ выше, чем при заражении на полностью сформированный монослой.

Литература

1. Сюрин В.Н. и др. Вирусные болезни. – М., 1998.
2. Орынбаев М.Б., Мамадалиев С.М., Кошметов Ж.К., Нурабаев С. Чума мелких жвачных животных в Республике Таджикистан Актуальные проблемы ветеринарной медицины и сельскохозяйственной биотехнологии Материалы международной научно-практической конференции. 19-20 мая 2005 г. – Павлодар. 2005. С. 66-71

3. *Орынбаев М.Б., Мамадалиев С.М., Хайруллин Б.М., Кошеметов Ж.К., Матвеева В.М., Нурабаев С.Ш., Ажибаев А.Ж., Катубаева Б.С., Мыктыбекова Ы.* Серологический мониторинг по чуме мелких жвачных животных в странах средней Азии // Третья научно-практ. конф. «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» г. Новосибирск 27-29 сентября 2006 года – Новосибирск. – 2006. С.176-177

4. *Kock R.A.* Detection and Genetic Characterization of Lineage IV Peste Des Petits Ruminant Virus in Kazakhstan / R.A. Kock, M.B. Orynbayev, K.T. Sultankulova, V.M. Strochkov, Z. D. Omarova, E. K. Shalgynbayev, N. M. Rametov, A. R. Sansyzybay and S. Parida // *Transbound Emerg Dis.* 2015 Oct;62(5):470-9. doi: 10.1111/tbed.12398.

5. Изучение чувствительности различных клеточных культур к вирусу чумы мелких жвачных животных / В.И. Диев, Л.Н. Соколов, Р.В. Мамкова [и др.] // Вирусные болезни с.-х. ж-ных: тез. докл. науч. – практ. конф. Владимир, 1995.- С. 94-96.

Шалгынбаев Э.К., Ілгекбаева Г.Д., Орынбаев М.Б.

ҰСАҚ КҮЙІС ҚАЙЫРАТЫН МАЛДАР ОБАСЫНЫҢ ВИРУСЫН БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ ӨСІНДІЛІК ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Аңдатпа

Бұл мақалада, ұсақ күйіс қайыратын малдар обасының вирусын бөліп алудың және олардың өсінділік қасиеттерін зерттеудің нәтижелері көрсетілген. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде індеттанулық көкейкесті изолят «ZHUALY KZ 2014» ұсақ күйіс қайыратын малдар обасының вирусы бөлініп алынды. Изоляттың торша өсіндісі қозы бүйрегінде (ПЯ) жақсы өсінділік қасиеттері анықталды.

Кілт сөздер: Вирус, ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы, бөлінді, торша өсіні, қозы бүйрегі.

Shalgynbayev E.K., Ilgkabayeva G.D., Orynbayev M.B.

ALLOCATION AND STUDYING THE CULTURE PROPERTIES OF THE VIRUS PESTE DES PETITS RUMINANTS

Summary

The results of studies on virus isolation Peste des Petits Ruminants in cell culture and the study of cultural properties of the isolated virus. The studies highlighted ehpizootological date isolate “ZHUALY KZ 2014” virus Peste des Petits Ruminants. It was found that the most appropriate system for the cultivation of “ZHUALY KZ 2014” virus isolate the plague of small ruminants is of primary culture cells were trypsinized lamb's kidney. Optimum conditions of cultivation of the allocated virus are defined.

Keywords: Virus, Peste des Petits Ruminants, isolate, culture of cages, lamb kidney.