

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛОНОВЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ТЕСТИКУЛ ЯГНЯТ К ВИРУСУ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА

*Б.Ш.Мырзахметова, Л.Б.Кутумбетов,
А.К.Наханов, М.Азанбекова,
М.Б.Орынбаев, К.Т.Султанкулова*
РГП на ПХВ «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК
Жамбылская область, Кордайский район

Аннотация

Испытания чувствительности различных биологических субстратов-продуцентов, приготавливаемых и используемых *in vitro*, показали, что к вирусу нодулярного дерматита наиболее чувствительны первичные, пассажные и клонные варианты культуры клеток тестикул ягнят. Уровень чувствительности этого вида субстрата-продуцента к репродуктивной форме вируса нодулярного дерматита близок к уровню результатов тестирования в ПЦР и на 20% и более превышает уровень чувствительности других видов культур клеток (первичная культура клеток почек ягнят, перевиваемые линии ТТ и MDBK), в которых проявляет цитопатогенность данный возбудитель. Исходя из технологичности получения, поддержания и производства, а также стандартности по чистоте от контаминантов, клонные варианты культуры клеток тестикул ягнят предпочтительны в использовании в вирусологических диагностических исследованиях и производстве культуральной биомассы возбудителя нодулярного дерматита для изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, культура клеток, репродукция, чувствительность, клон, пассаж, цитопатогенность, первичная культура клеток, перевиваемая культура клеток, титр

Введение

В исследованиях по выделению репродуктивной формы вируса и получению его биологической массы, наиболее технологичным и эффективным является использование чувствительных клеточных культур. Согласно данным ряда исследователей к вирусу нодулярного дерматита в разной степени чувствительны первичные культуры клеток, приготовленные

из почечной и тестикулярной ткани телят и ягнят, перевиваемые линии MDBK, СПЭВ, ВНК-21, Vero. При этом чувствительность перевиваемых линий клеток значительно уступает первичным культурам клеток [1, 2, 3, 4, 5]. Использование первичных культур клеток связано с технологическими трудностями, которые определяются сезонностью животных-доноров, нестандартностью их качества. В связи с чем, в своих предыдущих исследованиях, нами были получены клоновые популяции перевиваемых клеток из тестикулярной ткани ягнят, которые отличались стандартностью по морфофункциональным параметрам, чистотой от различных микробиологических контаминантов и способностью

поддерживаться в условиях лаборатории пересевами и/или криоконсервацией при сверхнизкой температуре. Клетки указанных культур имеют хромосомный набор, который свойствен первичным, и обладают способностью размножаться в пассажах, проводимых пересевами. Исходя из свойств клоновых культур клеток, которые придают им характерные признаки первичных клеток и позволяют поддерживать непрерывно пересевами или криоконсервацией в условиях лаборатории как перевиваемые, целью исследований являлось установление их чувствительности к вирусу нодулярного дерматита в сравнении с разными культурами клеток первичного и перевиваемого характера.

Материалы и методика исследований

Оценку чувствительности исследуемой культуры клеток к вирусу нодулярного дерматита проводили в сравнительном аспекте с другими первичными и перевиваемыми культурами клеток (ПЯ, ТТ, MDBK, ВНК-21, СПЭВ, Vero). Чувствительность культур клеток и репродуктивную активность вируса в них определяли путем первичного выделения из разных образцов биологических материалов, собранных от больных животных, и репродукцией культурального вируса, заранее выделенного из патологического материала.

В первом случае все испытываемые культуры клеток

заражали одними и теми же образцами различного патологического материала (цельной кровью, 20% суспензией лейкоцитов, 20% суспензией кожных нодул/узелков и секретов, выделяемых из носа, ротовой полости и конъюнктивы, а также мух, питавшихся на больном животном) в дозе 10^5 ТЦД₅₀. Затем вели ежедневное наблюдение микроскопией за состоянием монослоя клеток. Наличие вируса определяли по цитопатогенному действию возбудителя в монослое культуры клеток. Чувствительность культур клеток оценивали по срокам появления и интенсивности развития цитопатогенных

изменений, формируемых вирусом, а также по частоте выделения последнего. Культуру клеток для заражения вирусом готовили монослойно в пробирках. Выделенный вирус идентифицировали в реакции нейтрализации со специфической сывороткой крови от переболевших нодулярным дерматитом животных.

Образцы биологического материала, которые были использованы для тестирования чувствительности культур клеток, были собраны от 4-х голов крупного рогатого скота, больных нодулярным дерматитом на разной стадии развития болезни (инкубационный период, периоды проявления, развития и угасания клинических признаков). Болезнь воспроизводилась в эксперименте путем заражения животных вирулентным вирусом «НИИПББ-2019/К» [6]. При проведении исследований с животными соблюдали правила биологической этики обращения с экспериментальными животными и сохраняли полную биологическую безопасность, исключаящую распространение возбудителя болезни за пределы контролируемой территории.

В качестве векторного источника вируса использовали 8 популяций двух видов мух жигалок «*Stomoxys calcitrans*» и «*Haematobia*», питавшихся на двух больных животных.

Все образцы биологического материала, подвергаемые для тестирования на репродуктивный вирус, в параллельных

исследованиях изучались на наличие генома возбудителя нодулярного дерматита. Геномы вируса нодулярного дерматита выявлены и идентифицированы с помощью ПЦР, поставленной классическим вариантом. При этом для выделения и идентификации ДНК возбудителя использован диагностический набор «Тест-система для лабораторной диагностики нодулярного дерматита методом полимеразной цепной реакции», изготовленной РГП «НИИПББ» КН МОН Республики Казахстан.

В исследованиях по выделению вируса наличие вируса, в случае отсутствия его признаков при первичном заражении, устанавливали на протяжении трех последовательных слепых пассажей.

При оценке чувствительности культур клеток и репродуктивной активности вируса с использованием заранее выделенного возбудителя каждую испытываемую культуру клеток заражали параллельно в дозе 10^5 ТЦД₅₀ возбудителя и вели ежедневное наблюдение за состоянием монослоя инфицированных культур клеток. В качестве заражающего материала использовали вирулентный вирус нодулярного дерматита, выделенный от больных животных в пассажной популяции культуры клеток тестикул ягнят. В качестве питательной среды использовали питательную среду ПСП. Наличие вируса, также как и в предыдущем варианте исследований, устанавливали по цитопатогенному

действию возбудителя в монослое культуры клеток, чувствительность – по срокам наступления и интенсивности развития цитопатогенного действия, а также титру вируса, накопленного в каждом испытуемом варианте культуры клеток при максимальном развитии цитопатогенного действия. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [7].

При оценке чувствительности и возможности использования клоновых культур клеток тестикул ягнят для выделения вирулентного вируса из первичных источников возбудителя монослойную культуру клеток заражали образцами цельной крови, суспензией лейкоцитов, выделенных из крови, и суспензией

Основные результаты исследований НИР

При оценке чувствительности в первоначальных исследованиях испытывали различные перевиваемые линии клеток и первичные клеточные культуры, приготовленные из тестикулярной ткани ягнят с их пассажными популяциями, путем параллельного заражения образцами цельной крови, суспензий патологических материалов, собранных от

Таблица 1 – Результаты выделения вируса нодулярного дерматита *in vitro* с помощью различных культур клеток

кожных нодул, собранных от 4-х животных, больных нодулярным дерматитом в условиях эксперимента. Чувствительность оценивали в сравнительном аспекте с не клонированной популяцией пассажной культуры клеток тестикул ягнят по сроку появления и интенсивности развития цитопатогенного действия вируса. Выделенный вирус идентифицировали в реакции нейтрализации со специфической сывороткой крови на вирус нодулярного дерматита.

Оценку чистоты исследуемых биоматериалов от посторонних микологических и бактериальных контаминантов осуществляли согласно требованиям ГОСТ 28085-2013 [8].

животных, больных нодулярным дерматитом, а также мух, питавшихся на таком животном. Результаты установления чувствительности культур клеток к вирусу нодулярного дерматита при выделении его из первичных источников возбудителя приведены в таблице 1.

Культура клеток		Вирусосодержащий биоматериал					Результативность				
							выявлени я генома вируса		выделени я вируса в культуре клеток		% вы- де- ле- ния
Вид	Тип	Кровь	Лейкоциты	Секреты	Нодулы	Мухи	Абс.	%	Абс.	%	
							.		.		

ТЯ	Первичная	4/8	2/2	4/6	3/3	4/8	17/23	73,91	17/23	73,91	100
ТЯ	Пассажная	4/8	2/2	4/6	3/3	4/8	17/23	73,91	17/23	73,91	100
ПЯ	Первичная	2/4	2/2	1/3	3/3	н/и	10/12	83,3	8/12	66,6	80,0
ПЯ	Пассажная	2/4	2/2	1/3	3/3	н/и	10/12	83,3	8/12	66,6	80,0
ТТ	Перевиваемая	3/8	2/2	3/6	3/3	2/8	17/23	73,91	13/23	56,52	76,5
МДВК	Перевиваемая	2/8	1/2	1/6	2/3	0/8	17/23	73,91	6/23	26,08	35,3
СПЭВ	Перевиваемая	0/12	0/2	0/6	0/3	н/и	17/23	73,91	0/23	0,0	0,0
ВНК-21	Перевиваемая	0/12	0/2	0/6	0/3	н/и	17/23	73,91	0/23	0,0	0,0
Vero	Перевиваемая	0/12	0/2	0/6	0/3	н/и	17/23	73,91	0/23	0,0	0,0

Примечания

1 В знаменателе количество исследованных образцов

2 В числителе количество образцов, в которых обнаружен репродуктивный вирус в культуре клеток или его геном в ПЦР

3 Мухи, использованные для выделения вируса, предварительно вскармливались на животном, инфицированном вирусом нодулярного дерматита и находящиеся на разной стадии развития болезни

4 н/и - не исследовали

5 Абс. - количественный показатель выделяемости вируса

Как видно из данных таблицы 1, всего для выделения вируса были использованы 23 образца биологического материала, собранные от 4 голов крупного рогатого скота, экспериментально инфицированных вирусом нодулярного дерматита, а также 8 популяций мух, питавшихся на двух из этих животных. Образцы биологического материала собирались на разной стадии развития болезни у инфицированных животных. Перед исследованиями по выделению вируса из испытуемых образцов,

последние были предварительно протестированы молекулярно-генетическим методом на наличие генома вируса нодулярного дерматита. По данным этого метода из всего количества образцов, подвергнутых исследованию, в 17 было выявлено ДНК вируса нодулярного дерматита. Согласно результатам заражения культур клеток репродуктивный вирус с проявлением ЦПД выявлялся в первичной и пассажной культурах клеток, полученных из тестикул и почек ягнят, линии клеток ТТ и МДВК. В культурах клеток СПЭВ,

ВНК-21, Vero, инфицированных исследуемыми образцами биоматериалов, видимые признаки репродукции вируса не были обнаружены на протяжении трех последовательных «слепых» пассажей.

Анализ результативности выделения вируса в чувствительных субстратах-продуцентах показывает, что наибольшее количество положительных результатов устанавливалось при применении для выделения вируса первичной и пассажной культуры клеток, приготовленных из тестикул ягнят. Количественные показатели выделения вируса с помощью этих двух вариантов культуры клеток составили 73,91% от всего количества испытанных образцов и 100% от количества положительных образцов, установленных в ПЦР путем выявления генома искомого возбудителя. В первичной и пассажной культуре клеток, приготовленной из почечной ткани ягнят, выделение вируса отмечено в 66,66% случаев, в то время как из числа образцов, протестированных в этой культуре клеток, 83,3% оказались положительными на наличие ДНК вируса нодулярного дерматита. Сравнительный расчет положительных проб в ПЦР с положительными показателями выделения вируса в культуре клеток почек ягнят показывает, что чувствительность культуры из почечной ткани несколько уступает чувствительности культуры клеток тестикул ягнят, и в цифровом значении показатель выделяемости

вируса составляет 80,0%. Чувствительность перевиваемых культур клеток ТТ и MDBK была несколько ниже, чем предыдущих и по количеству выделения вируса она составила у культуры клеток ТТ - 56,52% от общего количества исследованных проб и 76,5% от общего количества положительных проб в ПЦР, а у культуры клеток MDBK - 26,08% от общего количества исследованных проб и 35,3% от общего количества положительных проб в ПЦР. Культуры перевиваемых клеток СПЭВ, ВНК-21, Vero, первоисточниками которых являются клетки почек свиньи, сирийского хомяка и обезьяны Макака резус, соответственно, оказались не чувствительными к вирусу нодулярного дерматита при первичном выделении из органов и тканей больного животного.

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что для первичного выделения вируса нодулярного дерматита из источников возбудителя болезни пригодными являются субстраты-продуценты, происходящие из тканей и клеток ягнят и телят, каковыми в наших экспериментах присутствовали культуры первичных, пассажных и перевиваемых клеток ягнят и телят. Из данного перечня культур клеток наиболее эффективными по результативности выделения вируса (чувствительности) являются первичные и пассажные культуры клеток тестикул ягнят.

В следующей серии экспериментов проводилась

аналогичная оценка чувствительности к вирусу нодулярного дерматита клоновых популяций клеток тестикул, полученных из пассажного варианта культуры клеток тестикул ягнят [5]. Оценку проводили путем заражения клоновых популяций культуральным вариантом вирулентного вируса в дозе $10^{5,0}$ ТЦД₅₀. Чувствительность клеток устанавливали по наличию ЦПД вируса, сроку появления и интенсивности его развития, а

также титру накапливаемого возбудителя. В качестве контроля служили результаты репродукции вируса в пассажной популяции культуры клеток ТЯ не подвергнутой клонированию. Результаты оценки чувствительности клоновых популяций культуры клеток ТЯ в сравнении с пассажным не клонированным вариантом той же культуры клеток к вирусу нодулярного дерматита приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты оценки чувствительности клоновых популяций пассажной культуры клеток ТЯ к вирусу нодулярного дерматита

Культура клеток ТЯ и ее клоны	Заражающая доза вируса, ТЦД ₅₀	Сроки появления ЦПД, сутки	Интенсивность развития ЦПД вируса на 7 сутки	Титр вируса, ТЦД _{50/см} ³
ТЯ пассажная	$10^{5,0}$	3-4	90 - 100	$10^{6,34 \pm 0,13}$
ТЯ клон-1	$10^{5,0}$	3-4	90 - 100	$10^{6,17 \pm 0,21}$
ТЯ клон-3	$10^{5,0}$	3-4	90 - 100	$10^{6,58 \pm 0,37}$
ТЯ клон-7	$10^{5,0}$	3-4	90 - 100	$10^{6,08 \pm 0,08}$
ТЯ клон-12	$10^{5,0}$	3-4	90 - 100	$10^{6,50 \pm 0,17}$
ТЯ клон-13	$10^{5,0}$	3-4	90 - 100	$10^{6,34 \pm 0,13}$

Как видно из данных таблицы 2, образцы культуры клеток тестикул ягнят, приготовленные из исходной пассажной и клоновых популяций клеток, обладают примерно одинаковой чувствительностью к репродукции вирулентного вируса нодулярного дерматита. При равной заражающей дозе вируса, составившей $10^{5,0}$ ТЦД₅₀ для всех образцов культуры клеток, ЦПД вируса во всех вариантах культур клеток проявлялось на 3-4 сутки, а к 7 суткам патогенному изменению

подвергалось более 90 % клеток монослоя, как в исходной пассажной, так и клоновых культурах клеток. Титр вируса, накопленного в процессе репродукции в каждом образце культуры клеток, колебался от $10^{6,00}$ ТЦД_{50/см}³ до $10^{6,75}$ ТЦД_{50/см}³, средние значения которых составили от $10^{6,08 \pm 0,08}$ ТЦД_{50/см}³ до $10^{6,58 \pm 0,37}$ ТЦД_{50/см}³. Разница титров вируса, установленная между пассажной и клоновыми вариантами культуры клеток, была

незначительной и составила в пределах от 0,17 до 0,24 lg ТЦД₅₀.

Таким образом, популяции клоновых культур клеток, полученные из исходной пассажной культуры клеток ТЯ, между собой и в сравнении с пассажной обладают примерно одинаковой чувствительностью к вирусу нодулярного дерматита. Установленная высокая чувствительность позволяет использовать испытанные клоновые популяции клеток в качестве субстрата-продуцента для первичного выделения этого возбудителя в диагностических исследованиях и продукции его биомассы с высокой биологической активностью в технологии производства вакцинного препарата.

С целью экспериментального подтверждения сделанного заключения в следующей серии экспериментов клоновые культуры клеток использовали в исследованиях по выделению вируса из первичных источников возбудителя болезни в сравнении с

Таблица 3 – Результаты выделения вируса нодулярного дерматита в клоновых и пассажных вариантах культур клеток тестикул ягнят

пассажной не клонированной культурой клеток. Для этого монослойную культуру клеток из трех клонового и не клонового вариантов, выращенную в пенициллиновых флаконах, заражали параллельно образцами 20% суспензий биоматериалов (кожные нодулы/узлы, цельная кровь, лейкоциты), собранных от 4-х больных животных, и вели ежедневное наблюдение путем микроскопии. Наличие вируса устанавливали по цитопатогенному действию в монослое культуры клеток. Чувствительность испытуемых культур клеток оценивали по скорости (срок появления) появления и развития цитопатогенного действия. Выделенный вирус идентифицировали в реакции нейтрализации со специфической сывороткой крови на вирус нодулярного дерматита. Результаты оценки чувствительности клоновых и исходных пассажных вариантов культуры клеток приведены в таблице 3.

Культура клеток		Исследуемый биоматериал			Результативность выделения		Специфичность, вирус НД
Вид	Тип	Кровь	Лейкоциты	Нодулы	Абс.	%	
ТЯ	Пассажная	4*/4	4/4	4/4	12/12	100	+
ТЯ	Клон-3	4*/4	4/4	4/4	12/12	100	+
ТЯ	Клон-7	4*/4	4/4	4/4	12/12	100	+
ТЯ	Клон-12	4*/4	4/4	4/4	12/12	100	+
Примечания							
1 В знаменателе количество исследованных образцов.							
2 В числителе количество образцов, в которых обнаружен репродуктивный							

вирус в культуре клеток.

3 «*» - вирус выделен в дополнительном «слепом» пассаже.

4 «+» - выделенный вирус нейтрализовался со специфической сывороткой на вирус нодулярного дерматита в реакции нейтрализации в культуре клеток.

5 «НД» - нодулярный дерматит.

Как видно из данных таблицы 3, вирус выделялся из всех испытанных 12 образцов трех видов биологических материалов с помощью всех использованных клоновых и не клонового пассажного варианта культуры клеток тестикул ягнят. Из образцов крови во всех случаях вирус выделялся в дополнительных пассажах. Выделенный вирус полностью нейтрализовывался со специфической сывороткой крови на вирус нодулярного дерматита.

Обсуждение полученных данных и заключение

Культуры клеток, способные поддерживаться в лабораторных условиях путем пересевов, и не имеющие канцерогенных начал, дают возможность использовать их в широкой практике вирусологических исследований и производства биологических препаратов [9, 10]. Для вирусологических исследований наиболее пригодны высокочувствительные культуры клеток, к которым, обычно, относятся первичнотрипсинизированные. Но этот тип культуры клеток требует постоянного наличия и использования животных-доноров органов, из которых диспергируются необходимые клетки. Заменить такой тип культуры клеток удастся редко, так как перевиваемые культуры клеток

Полученные результаты свидетельствуют о том, что клоновые варианты и материнский пассажный вариант культуры клеток тестикул ягнят обладают одинаково высокой чувствительностью к вирусу нодулярного дерматита. В связи, с чем они могут использоваться в диагностических исследованиях по выявлению репродуктивного вируса нодулярного дерматита в первичных источниках возбудителя болезни.

обладают в значительной степени низкой чувствительностью и в большей части имеют начало канцерогенности. Поэтому, в связи с наступившей актуальностью вирусологических исследований с вирусом нодулярного дерматита и производства вакцинного препарата против болезни, вызываемой этим возбудителем, нами в своих предыдущих исследованиях были получены популяции пересеваемых клеточных клонов из тестикулярной ткани ягнят. Цитоморфофункциональная, кариологическая характеристика данных клоновых клеток близко напоминает первичные клетки тестикул ягнят. Получение и поддержание в условиях лаборатории указанных культур клеток обусловила необходимость

проверки их чувствительности к вирусу нодулярного дерматита.

Чувствительность клоновых культур клеток к вирусу нодулярного дерматита оценивали в сравнительном аспекте с культурами клеток, которые уже ранее подвергались изучению, и данные о которых имеются в публикациях как отечественных, так и зарубежных исследователей [11-18]. Оценку чувствительности культур клеток изучали в двух вариантах с использованием вирулентного вируса. В первом случае для тестирования искомого показателя применили вирусное выделение из образцов биоматериалов, собранных от больных животных. Такой вирус является природным и не адаптированным в условиях *in vitro*. В связи с чем результаты таких исследований более полно и достоверно показывают истинную чувствительность применяемых биологических моделей субстратов. Во втором варианте исследований для проверки/оценки чувствительности использовали также вирулентный вирус нодулярного дерматита, но уже двумя пассажами сенсibilизированный к репродукции *in vitro* в культуре клеток тестикул ягнят.

В первом варианте экспериментов были использованы первичные культуры клеток почек и тестикул ягнят, пересеваемые пассажные субпопуляции этих культур клеток и перевиваемые линии клеток ТТ, MDBK, ВНК-21, СПЭВ, Vero. Все эти культуры клеток для исследований

готовились монослоем, выращенным в пенициллиновых флаконах. Для заражения вирусом (тканевым и культуральным) перевиваемые линии использовали в одно-двух суточном возрасте с неплотным монослоем. Первичную и пассажную пересеваемую субкультуру клеток заражали вирусом после формирования полного монослоя, сроки которого для первичной наступало на 5-7 сутки, а для субкультур - на 2 сутки.

Результаты заражения образцами патологических материалов показало, что наиболее высокой чувствительностью к вирусу нодулярного дерматита обладает культура клеток, приготовленная из тестикулярной ткани ягнят. Положительные данные, полученные на этой культуре клеток, достоверно и равнозначно подтверждались позитивными данными выявления генома вируса нодулярного дерматита с помощью ПЦР. Чувствительность первичных и пассажных субкультур клеток тестикул ягнят была одинаковой. Согласно ряду публикаций, сделанных отечественными и зарубежными авторами, при вирусологических диагностических и производственных работах, связанных с вирусами оспы овец и оспы коз, которые, также как и вирус нодулярного дерматита, относятся к роду *Capripoxvirus*, используются культуры клеток, полученные из почечной ткани ягнят. Поэтому, для сравнительной оценки чувствительности этих культур клеток в своих

исследованиях были также испытаны культуры, приготовленные из почечной ткани. Однако, как показали результаты исследований, чувствительность почечных клеток ягнят к вирусу нодулярного дерматита значительно уступало тестикулярным. Разница чувствительности двух видов культур клеток в числовом выражении составила 20%. Первичные и пассажные субкультуры обладали одинаковой чувствительностью к вирусу нодулярного дерматита.

Из числа перевиваемых линий чувствительными оказались культуры клеток, которые происходят из почечной и тестикулярной тканей крупного рогатого скота. Сравнительный анализ показал, что и среди двух перевиваемых культур клеток, которые имеют начало из органов одного вида животного, большей чувствительностью к вирусу нодулярного дерматита обладает также культура клеток тестикулярного происхождения. По отношению к положительным данным, подтвержденным в ПЦР, чувствительность линии клеток ТТ в числовом выражении составила 76,5%, а культуры клеток MDBK, происходящей из почечной ткани крупного рогатого скота, - 35,3%. Перевиваемые линии клеток, имеющие происхождение из органов других видов животных (свиньи и хомяка), оказались не чувствительными к испытываемому вирусу.

В исследованиях, проведенных с клоновыми

культурами клеток тестикул ягнят в сравнении с теми же культурами клеток, но подвергшихся клонированию, чувствительность всех вариантов культур клеток к вирусу нодулярного дерматита была одинаковой. При этом репродукция вируса, выражавшаяся формированием цитопатогенных изменений, появлялась одновременно и развивалась с одинаковой скоростью. В этих исследованиях, в которых для заражения культур клеток использовали культуральный вирус, кроме чувствительности была показана уровень накопления тестового возбудителя, который измерялся титром цитопатогенности. Титрование культуральной суспензии с репродуцированным вирусом в каждой культуре клеток показало, что числовые значения их титров колеблются в пределах от $10^{6,08}$ ТЦД_{50/см}³ до $10^{6,58}$ ТЦД_{50/см}³, разница между которыми составляет не значимую величину, составляющую от 0,09 до 0,50 Ig ТЦД₅₀.

Использование трех клоновых культур клеток в сравнении с пассажной не клонированной популяцией для выделения вируса из органов и тканей больных животных показало, что оба типа испытываемых клеточных субстратов обладают достаточной и одинаковой чувствительностью к вирусу нодулярного дерматита. Всего в этих исследованиях были испытаны 12 образцов 3 видов биоматериалов, собранных от 4 больных животных. В результате

инфицирования из всех 12 испытуемых образцов биоматериалов был выделен вирус нодулярного дерматита как в клоновых культурах, так и не клонированной пассажной субкультуре клеток тестикул ягнят. Наиболее активно и быстро вирус выделялся из проб лейкоцитов и суспензий кожных нодул/узелков. Цитопатогенное действие вируса в культуре клеток при заражении пробами указанных тканей наступало сразу на первом пассаже через 3-5 суток, а при заражении цельной кровью срок проявления вирусных поражений удлинялся и наступал только на втором, а иногда на третьем пассаже.

Таким образом, из числа испытанных культур клеток к вирусу нодулярного дерматита наиболее чувствительны культуры клеток, приготовленные из тестикулярной ткани ягнят в виде первичных, пассажной субкультуры и клоновых вариантов. Согласно полученным результатам уровень чувствительности тестикулярной культуры клеток близок к индикаторной активности молекулярно-генетического метода тестирования, в случае диагностического исследования с репродуктивным вирусом. Культура клеток из тестикулярной ткани ягнят обладает также высокой продуктивностью по отношению вирусных частиц возбудителя нодулярного дерматита. Титры вируса, репродуцированного в этой культуре клеток (первичной, пассажной, клоновой), составляют

от $10^{6,0}$ ТЦД_{50/см³. В связи с высокой чувствительностью и продуктивностью культура клеток из тестикулярной ткани ягнят наиболее предпочтительны в использовании ее в технологиях первичного выделения и производства биомассы вируса нодулярного дерматита, которые являются основными составными частями вирусологической диагностики болезни и производства биологических препаратов (диагностикумов и вакцин). Из числа испытанных вариантов культуры клеток тестикул ягнят пассажная субкультура и клоновые популяции клеток являются технологичными в получении, поддержании и приготовлении по сравнению с первичнотрипсинизированной, а также гарантированно безопасны в отношении риска присутствия контаминантов.}

Чувствительностью к вирусу нодулярного дерматита также обладают первичная культура клеток почек ягнят и перевиваемая линия «ТТ», происходящая из тестикулярной ткани теленка. Однако степень их чувствительности к данному возбудителю значительно уступает таковым культуры клеток из тестикулярной ткани. В сравнительном аспекте чувствительность культуры клеток почек ягнят уступает чувствительности культуры клеток тестикул тех же видов животных в цифровом значении на 20%, а линий клеток «ТТ» - на 23,5%, MDBK - 64,7%. Культуры клеток перевиваемого характера,

происходящие из органов других видов животных (свиньи и хомяка),

не проявляют чувствительность к вирусу нодулярного дерматита.

Список литературы

1. Шумилова И.Н., Кононова С.В., Манин Л.Б., Коропова Н.В., Кононов А.В. Культивирование вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота в перевиваемых линиях культур клеток//Лабораторная практика. - М. 2017. - С. 53-57.

2. Tuppurainen E.S.M., Pearson C.R., Bachanek-Bankowska K., Knowles N.J., Amareen S., Frost L., Mertens P.P.C. Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus //Antiviral Research. - 2014. - Vol. 109(1). - p. 1 - 6.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. Кутумбетов Л.Б., Мырзахметова Б.Ш., Орынбаев М.Б. и др. Штамм «НИИПББ-2019/К» вируса нодулярного дерматита типа «Нитлинг», используемый для контроля иммуногенности живых и инактивированных вакцин против нодулярного дерматита крупного рогатого скота. Заявление о выдаче патента РК на изобретение. Регистрационный номер 2019/0814.1

7. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer.J. Hyg. - 1938. - Vol. 27. - p. 493-497.

8. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности.

9. Циванюк М.А., Дрыгин В.В. Использование перевиваемой культуры клеток MDCK для выделения вируса гриппа птиц//Научные основы в области охраны здоровья животных. ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных». - Владимир, 1994. - С. 67-72.

10. Миронова Л.Л. Опыт получения и применения первичных и перевиваемых культур клеток//Культивирование клеток животных и человека: Тез.докл. - Пушино, 1992. - С. 96-103.

11. Binepal Y.S., Ongadi F.A., Chepkwony J.C. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 68:151-153 (2001).

12. Tuppurainen E.S. M., Venter E.H., Coetzer J.A. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J.Vet.Res.* 2005; 72(2): 153-164.

13. Балышева В.И., Живодеров С.П., Пивова Е.Ю. и др. Пермиссивность культур клеток различного происхождения при культивировании вируса нодулярного дерматита. *Сельскохозяйственная биология*. 2017. том 52. № 6. - С.1265-1272.

14. Babiuk Sh., Parkyn G., Copps J., Larence J.E., Sabara M.I., Bowden T.R., Boyle D.B., Kitching R.P. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *Journal Vet Diagn Invest* 19:486-491 (2007).

15. Hay R.J. The seed stock concept and quality control for cell lines. 1988. *Anal Biochem* 17:225-237.

16. Jassim F.A., Keshavamurthy B.S. Cytopathic changes caused by sheep pox virus in secondary culture of lamb testes cells. 1981. *Bull Off Int Epizoot* 93:1401-1410.

17. Kalra S.K., Sharma V.K. Adaptation of Jaipur strain of sheeppox virus in primary lamb testicular cell culture. 1981. *Indian J Exp Biol* 19:165-169.

18. Zhou J.S., Ma H.L., Guo Q.S. Culturing of ovine testicular cells and observation of pathological changes of the cell inoculated with attenuated sheep pox virus. 2004. *Chinese J Vet Sci Technol* 34:71-74.

References

1. Shumilova I.N., Kononova S.V., Manin LB, Koropova N.V., Kononov A.V. The cultivation of the lumpy skin disease virus in cattle in transplantable cell culture lines // *Laboratory practice*. - M. 2017. - p. 53-57.

2. Tuppurainen E.S. M., Pearson C. R., Bachanek-Bankowska K., Knowles N. J., Amareen S., Frost L., Mertens P. P. C. Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus // *Antiviral Research*. - 2014. - p. 109 (1). - P. 1 - 6. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.06.009>.

3. Kutumbetov LB, Myrzakhmetova B.Sh., Shmanov G.S. The sensitivity of primary cultures of cells from the kidneys and testicles of lambs and kids of lumpy skin disease virus // "Izdenister, natizheler - Research, results." No. 4 (80) 2018. - p. 10-15.

4. Nisanova R.K., Rystaeva R.A., Kerimbaev A.A., Omarova Z.D., Orynbaev M.B. Choice of a sensitive system for the cultivation of the virus of lumpy skin disease virus of cattle // "Izdenister, natizheler - Research, results". No. 4 (80) 2018. - p. 26-32.

5. Kutumbetov LB, Myrzakhmetova B.Sh. The results of the forced adaptation of testicle and kidney cells of lambs and kids to continuous growth in vitro // "Bulletin of the Kazakh Agro-Technical University named after S.Seifullin. " No. 4 (99) /2018. - p. 96-104.

6. Kutumbetov LB, Myrzakhmetova B.Sh., Orynbaev M.B. The strain "RIBSP-2019 / K" lumpy skin disease virus type "Neethling" used to control the immunogenicity of live and inactivated vaccines against lumpy skin disease in cattle. Application for the grant of a patent of the Republic of Kazakhstan for an invention. Registration number 2019 / 0814.1

7. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer.J. Hyg. - 1938. - p. 27. - P. 493-497.

8. GOST 28085-2013. Biological medicinal products for veterinary use. The method of bacteriological control of sterility.

9. Tsivanyuk M.A., Drygin V.V. The use of transplantable MDCK cell culture for isolation of avian influenza virus // Scientific principles in the field of animal health. Federal State Institution "Federal Center for Animal Health". - Vladimir. - 1994. - p. 67-72.

10. Mironova L.L. The experience of obtaining and using primary and transplantable cell cultures // Cultivation of animal and human cells: Abstracts. - Pushchino, 1992. - V. 96-103.

11. Binopal Y.S., Ongadi F.A., Chepkwony J.C. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 68:151-153 (2001).

12. Tuppurainen E.S. M., Venter E.H., Coetzer J.A. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. Onderstepoort J.Vet.Res. 2005; 72(2): 153-164.

13. Balysheva V.I., Zhivoderov S.P., Pivova E.Yu. et al. Permissibility of cell cultures of various origin during cultivation of lumpy skin disease virus. Agricultural biology. 2017. Volume 52. No. 6. - p.1265-1272.

14. Babiuk Sh., Parkyn G., Copps J., Larence J.E., Sabara M.I., Bowden T.R., Boyle D.B., Kitching R.P. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. Journal Vet Diagn Invest 19:486-491 (2007).

15. Hay R.J. The seed stock concept and quality control for cell lines. 1988. Anal Biochem 17:225-237.

16. Jassim F.A., Keshavamurthy B.S. Cytopathic changes caused by sheep pox virus in secondary culture of lamb testes cells. 1981. Bull Off Int Epizoot 93:1401-1410.

17. Kalra S.K., Sharma V.K. Adaptation of Jaipur strain of sheeppox virus in primary lamb testicular cell culture. 1981. Indian J Exp Biol 19:165-169.

18. Zhou J.S., Ma H.L., Guo Q.S. Culturing of ovine testicular cells and observation of pathological changes of the cell inoculated with attenuated sheep pox virus. 2004. Chinese J Vet Sci Technol 34:71-74.

ҚОЗЫ ТЕСТИКУЛАСЫНАН АЛЫНҒАН КЛОНДЫҚ ЖАСУША ӨСІНДІЛЕРІНІҢ ТҮЙІНДІ ДЕРМАТИТ ВИРУСЫНА СЕЗІМТАЛДЫЛЫҒЫ

*Б.Ш.Мырзахметова, Л.Б.Кутумбетов,
А.К.Наханов, М.Азанбекова,
М.Б.Орынбаев, К.Т.Султанқұлова*

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ШЖК РМК ҚР БҒМ ҒК, Жамбыл облысы

Түйін

Мақалада әртүрлі жасуша өсінділерінің нодулярлы дерматит вирусына сезімталдығын зерттеу нәтижелері келтірілген. Биологиялық модель ретінде қозының бүйрек және аталық безінен алынған алғашқы жасушалар өсінділерін, осы жасуша өсінділерінің пассажды субпопуляцияларын және дамылсыз өсетін ТТ, MDBK, ВНК-21, СПЭВ, Vero жасушалық өсінділерін қолдандық. Тексерілген жасуша өсінділерінің ішінде нодулярлы дерматит вирусына алғашқы, пассивті субкультура және клондық нұсқалар түрінде қозылардың жасушалық ұлпаларынан алынған жасуша өсінділері ерекше сезімтал болды. Жасалынған жұмыс нәтижелері бойынша қозының аталық безінен алынған алғашқы жасушалар өсінділерінің сезімталдық деңгейі репродуктивті вируспен диагностикалық зерттеу жүргізілген жағдайда молекулалық-генетикалық тестілеу әдісінің индикаторлық белсенділігіне жақын. Қозының аталық безінен алынған алғашқы жасушалар өсінділері, сонымен қатар, нодулярлы дерматит қоздырғышының вирустық бөлшектеріне қатысты жоғары өнімділікке ие. Сандық тұрғыдан алғанда нодулярлы дерматит вирусына дамылсыз өсетін ТТ жасуша линиясының сезімталдығы 76,5%, ал ірі қара малдың бүйрек тінінен шығатын MDBK жасушаларының өсіндісі 35,3% құрады. ВНК-21, СПЭВ, Vero сияқты дамылсыз өсетін жасуша өсінділері нодулярлы дерматит вирусына сезімталдықты көрсеткен жоқ.

Кілттік сөздер: түйінді дерматит вирусы, жасуша өсіндісі, көбею, сезімталдық, клон, пассаж, цитопатогенділік, алғашқы жасуша өсіндісі, дамылсыз өсетін жасуша өсіндісі, титр

SENSITIVITY OF A CLONIC CELL CULTURE POPULATION TESTICULES LAMBS TO LUMPY SKIN DISEASE VIRUS

*B.Sh.Myrzakhmetova, L.B.Kutumbetov
A.K.Nakhanov,*

*M.Azanbekova, M.B.Orynbayev,
K.T.Sultankulova,
Ministry of Education and Science
of the Republic of Kazakhstan Science Committee
«Research Institute for Biological Safety Problems»,
Zhambyl region,*

Summary

The article presents the results of studies on the sensitivity of various cell cultures to the lumpy skin disease virus. As a biological model, we used primary cultures of kidney cells and testicles of lambs, transplanted passive subpopulations of these cell cultures and transplanted cell lines TT, MDBK, BHK-21, PKEV and Vero. Of the tested cell cultures, the most sensitive were the cell cultures prepared from the testicular tissue of the lambs in the form of primary, passive subculture and clone variants to the lumpy skin disease virus. According to the results, the sensitivity level of the testicular cell culture is close to the indicator activity of the molecular genetic testing method, in the case of a diagnostic study with a reproductive virus. The cell culture from the testicular tissue of lambs also has high productivity with respect to viral particles of the pathogen of lumpy skin disease. The sensitivity of the TT cell line nodular dermatitis virus in numerical terms was 76.5% and the culture of MDBK cells originating from cattle kidney tissue was 35.3%. Transplanted cell cultures such as BHK-21, PKEV, Vero did not show sensitivity to the lumpy skin disease virus.

Key words: lumpy skin disease virus, cell culture, reproduction, sensitivity, clone, passage, cytopathogenicity, primary cell culture, transplantable cell culture, titer