

К.Н. Жасланова¹, Г.М. Салхожаева², Ж.А. Рахимжанова³, М.К. Тыныкулов⁴,
И.А. Пунтус⁵, К.М. Уразов⁶

¹⁵⁶ ТОО «Biotron Group», Степногорск, Казахстан

²³⁴ Кафедра биотехнологии и микробиологии Евразийского национального университета
имени Л.Н.Гумилева, Астана, Казахстан

(E-mail: karlygash_1506@mail.ru, gaukhar_7077@mail.ru, zhanar0803@mail.ru,
tynykulov@list.ru, puntusira@mail.ru, kunya_93-31@mail.ru)

Отработка технологии накопления вируса оспы овец

Аннотация: В статье представлены результаты адаптации и отработка оптимальных параметров накопления вируса оспы овец штамм на перевиваемых культурах клеток 3-КГ, ЯДК-04 и ПО-2. Инфекционная активность при заражении ВОО на полный сформированный монослой, составила 5,0-5,75 lg ТЦД₅₀/см³ на линии ЯДК и 5,5-6,0 lg ТЦД₅₀/см³ на 3-КГ, при множественности заражения 0,1-0,5 ТЦД₅₀/кл., время инкубации составляло 72-96 часов. Отработана методика определения инфекционного титра вируса пробирочным и микропланшетным методами, проведен корреляционный анализ. Анализ результатов определения инфекционной активности вируса оспы, показал сопоставимость получаемых данных с расхождением на +0,1-0,5 lg (+0,25) в сторону микропланшетного метода (n=7), что свидетельствует о его более высокой чувствительности и точности.

Ключевые слова: вирус оспы овец, вакцина, штамм, культура, титр, монослой, инкубация, инфекция.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2019-126-1-37-45>

Введение. Оспа овец (Sheep pox) – высококонтагиозная особо опасная болезнь, характеризующаяся лихорадкой и образованием в эпителии кожи и слизистых оболочек папулезно-пустулезных поражений. Болезнь широко распространена в Турции, Иране, Пакистане, Афганистане, Индии, Марокко, Алжире, Тунисе, Ливии, Кувейте и многих других странах Азии и Африки.

Согласно решению МЭБ оспа овец и коз отнесена к группе А - быстро распространяющихся болезней животных. Болезнь наносит овцеводству огромный ущерб, включающий потери от гибели и вынужденного убоя больных животных, снижение продуктивности, обострение вторичных инфекций, затраты на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий. Оспа мелкого рогатого скота остается актуальным заболеванием в мире, о чем свидетельствуют случаи ее регистрации в последние годы в разных странах мира (Китай, 2002-2003; Монголия, 2006; Греция, 2007; Турция, 2001; Таджикистан, 2001; Вьетнам, 2005; Россия, 2012 и другие) [1, 2, 3].

В случаях генерализованного и осложненного течения болезни гибель овец достигает 50% от количества заболевших. Вирус передается животным в основном аэрогенным путем. Виремия наступает перед генерализацией процесса. У больных животных вирус максимально локализуется в оспинах. Он не имеет антигенных вариантов. Переболевание сопровождается длительным иммунитетом (не менее двух лет) и образованием антител, которые с молозивом и молоком передаются потомству [4, 5, 7].

В настоящее время эпизоотическая ситуация по оспе овец в Республике Казахстан и в сопредельных государствах остается напряженной, что требует проведения массовой иммунизации животных эффективными вирус-вакцинами. В связи этим разработка и применение отечественной вакцины для профилактики оспы овец является актуальной задачей ветеринарной науки. Вакцина для профилактики оспы овец «НИСХИ» (научно-исследовательский сельскохозяйственный институт) является экспортно-ориентированной разработкой [8, 9].

Целью наших исследований являлась адаптация штамма вируса оспы овец «НИСХИ» к подбираемым чувствительным культурам клеток и отработка технологии накопления вируса оспы овец для последующего создания вакцины против оспы овец.

Для этой цели нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести адаптацию штамма вируса оспы овец «НИСХИ» к подбираемым чувствительным культурам клеток;
2. Отработка технологии накопления вируса оспы овец штамм «НИСХИ»: провести подбор дозы заражения культуры клеток вирусом оспы (в ТЦД₅₀/кл) и определение инфекционной активности вируса, провести определение сроков максимального накопления вирусной биомассы, максимальной инфекционной активности вируса (\lg ТЦД₅₀/см³) и сравнительную оценку результатов исследований при титрации вируса пробирочным способом и на микропланшетах.

Методы исследований. Адаптацию вируса оспы штамм «НИСХИ» проводили в течение 4-х последовательных слепых пассажей на полный монослой клеток в объемной дозе 1:10, при этом инфекционную активность вируса определяли только на последнем пассаже. После слепых пассажей провели 3 прямых пассажа с определением активности вируса оспы овец (ВОО) к адаптируемой клеточной линии.

Титрацию вируса оспы овец (определение инфекционной активности вируса) проводили на культуре клеток пробирочным способом и в 96-ти луночных микропланшетах. Расчет титра вируса производили по методу Кербера-Ашмарина и выражали в \lg ТЦД₅₀/см³. Результаты десяти титраций ВОО сравнивали пробирочным и микропланшетными способами и выводили корреляционную зависимость показателей.

Схему накопления ВОО отрабатывали на перевиваемых клеточных моделях 3-КГ и ЯДК-04. Накопление биомассы ВОО отрабатывали в двух модификациях: на сформированный клеточный монослой с контактом и сменой питательной среды на поддерживающую и с заражением на растущую клетку. Ежедневно проводили микроскопию контрольного интактного и инфицированного клеточного монослоя, оценивая степень его поражения и сравнивая ее с контролем.

По первой методике ВОО вносили в матрасы с культурой клеток при полностью сформированном монослое (48-72 часа, 85–100% площади зарастания) со сменой ростовой культуральной среды на поддерживающую и контактом вируса с клетками на 60–90 минут. Множественность заражения вирусом подбиралась в диапазоне 0,01, 0,1, 0,5 и 1,0 ТЦД₅₀/кл. После заражения вирусом через 24, 36, 48, 72, 96 и 120 часов культивирования отбирали вирусосодержащий материал для определения титра инфекционной активности вируса, фиксируя степень поражения клеточного монослоя в % во временном интервале. Контролем служили интактные матрасы с культурой клеток со сменой ростовой питательной среды и без смены.

Накопление по методике с заражением на растущую клетку проводили при одновременном внесении клеточной суспензии на ростовой питательной среде и ВОО. При этом определяли следующие параметры: посевную концентрацию клеток (тыс./мл), множественность заражения посевным вирусом (ТЦД₅₀/кл), срок инкубации материала (ч), процент поражения клеточного монослоя во временном интервале, активность полученного вакцинного вируса. Контролем служили интактные матрасы с культурой клеток без смены ростовой питательной среды.

Инфекционную активность полученного в каждом опыте вирусного материала определяли методом титрации на культуре клеток по вышеописанным методикам [10].

Стерильность используемых культур клеток, вирусосодержащей жидкости, питательных сред, сывороток и других материалов испытывали методом прямого посева на селективные питательные среды на каждом этапе проводимых работ [11].

Результаты и их анализ. Используемый в работе штамм ВОО адаптирован и поддерживался на перевиваемой культуре клеток ПО, культивируемой в полусинтетической питательной среде на эмбриональной сыворотке крови в титрах $5,25 \pm 0,25 \lg$, в статических условиях культивирования.

Нами была поставлена задача адаптировать вирус оспы овец штамм «НИСХИ» - к перевиваемым культурам клеток 3-КГ, ЯДК-№-04 и ПО-2, которые прошли депонирование в лабораторной коллекции. Адаптацию проводили в течение 4-х последовательных слепых пассажей на полный монослой клеток в объемной дозе 1:20, с контактом 60-90 минут, при этом инфекционную активность вируса определяли только на последнем пассаже. Полученный вирус оспы первого пассажа подвергали заморозке в течение 24 часов, затем биомассу использовали для получения второго пассажа вируса и так далее до 4-го пассажа.

После 4-х слепых пассажей провели 3 прямых пассажа с определением активности вируса оспы к адаптируемой клеточной линии, при этом проводили заражение на полный монослой клеток, с контактом 90 минут, и множественностью заражения 0,25-0,35 ТЦД₅₀ /кл. Титр вируса оспы овец на культуре клеток ЯДК-04 составил $5,45 \pm 0,25 \lg$, на линии 3-КГ - $5,75 \pm 0,25 \lg$, на культуре ПО-2 - $5,0 \pm 0,25 \lg$ (n=3). В то же время культивирование вируса в линии ПО-2 на эмбриональной сыворотке крови показало результаты сравнительные с накоплением в линиях 3-КГ и ЯДК-04.

Параллельно провели 3 прямых пассажа ВОО на первичных линиях ПО-2 и ТЯ для сравнительной оценки накопления вирусного материала. Инфекционная активность вируса на обеих линиях составляла $5,75 \pm 0,25 \lg$ (n=3) (таблица-1).

Культура клеток	Титр вируса
ЯДК-04	$5,45 \pm 0,25 \lg$
3-КГ	$5,75 \pm 0,25 \lg$
ПО-2	$5,0 \pm 0,25 \lg$

Таблица 1 – Результаты определение активности вируса оспы к адаптируемой клеточной линии

Из таблицы 1 видно, что наиболее перспективными при накопления вируса оспы показали себя перевиваемые линии клеток 3-КГ и ЯДК-04, так как являются наиболее удобными в культивировании, дают высокие выходы клеток в пассажах, менее экономически и трудозатратные, позволяют накапливать удовлетворительные титры инфекционной активности ВОО. Титр вируса в первичных линиях ПО и ТЯ так же был высоким, однако приготовление этих линий является нетехнологичным, не позволит масштабировать накопление вируса оспы при изготовлении вакцины в промышленных условиях (потребуется убой большого количества молодняка животных, высокий риск контаминации, трудоемкий процесс трипсинизации клеток, высокие посевные концентрации, для проведения пассажей требуется непрерывный убой животных). Исходя из вышеперечисленного первичные линии ПО и ТЯ использовали в дальнейшей работе только для освежения инфекционных свойств вируса и поддержания его инфекционной активности.

По итогам адаптации ВОО было принято решение об использовании двух перевиваемых линий клеток 3-КГ и ЯДК-04 для отработки параметров накопления вируса и изучения его свойств.

Накопление биомассы вируса проводили в двух модификациях: на сформированный клеточный монослой (85-100%) с контактом и сменой питательной среды на поддерживающую и с заражением на растущую клетку.

Для работы использовали ВОО, адаптированный к соответствующим перевиваемым культурам клеток с известной инфекционной активностью ($\lg \text{TCD}_{50} / \text{см}^3$).

При заражении на сформированный клеточный монослой использовали 48 и 72 часовой монослой культуры клеток 3-КГ и ЯДК-04, выращенный в клинских матрасах объемом 1,5 л в стационарных условиях. Перед заражением культуры клеток из флаконов удаляли ростовую среду, монослой отмывали фосфатно-солевым буферным раствором Хенкса от продуктов жизнедеятельности клеток. Затем культуры клеток заражали ВОО по объемной дозе заражения и помещали на контакт в термостат при температуре $(+37 \pm 0,2)^0 \text{C}$ на 1,0-1,5 часа. После контакта матрасы заливали поддерживающей питательной средой для культуры клеток 3-КГ – ФГМС+ДМЕМ (3:1) с глюкозой и глутамином в дозировках 0,2 г/л и 100-150 мг/л соответственно, для культуры клеток ЯДК-04 – ИГЛА+ДМЕМ (1:1) с 1% раствора аминокислот. Для обеих зараженных культур поддерживающую среду обогащали

2% сыворотки крови крупного рогатого скота. Оставляли по одному матрасу с интактной культурой клеток для сравнительного контроля состояния клеточного монослоя культур.

Микроскопию зараженных матрасов и контроль клеток проводили ежедневно в течение 5 суток. Матрасы с ярко выраженными цитопатическими изменениями клеточного монослоя на уровне поражения 80-100% замораживали при температуре минус 20°C для хранения и дальнейшего использования. Цитопатическое действие (ЦПД) вируса оспы овец на культуру клеток 3-КГ и ЯДК-04 проявлялось в следующем: вытянутая клетка округлялась, теряла поверхностные выступы, клетки образовывали небольшие группы и типичные «гроздьи», и в конечной стадии наблюдалась гибель клеток, при этом часть клеток отделялась от стекла культуральной емкости, часть оставалась прикрепленной с видоизмененной морфологией (рисунок -1).

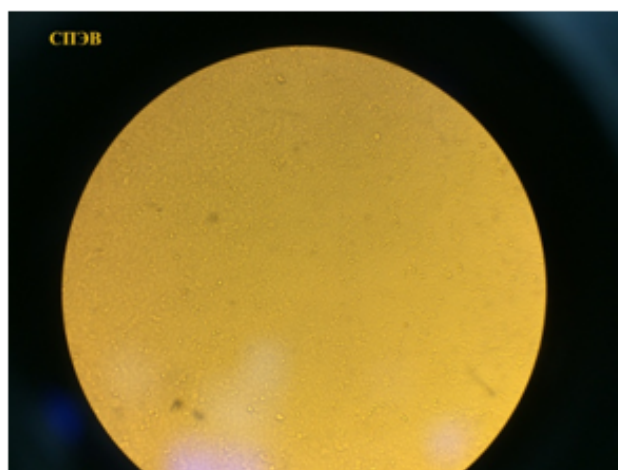


Рисунок 1 – Цитопатическое действие (ЦПД) вируса оспы овец на культуру клеток

Интактный контроль клеток 3-КГ и ЯДК со сменой питательной среды на поддерживающую оставался без видимых изменений (без ЦПД) с типичной для каждой культуры морфологией, к 3-5-м суткам появлялись на поверхности монослоя округлые клетки, находящиеся в стадии старения.

Определение титра инфекционной активности ВОО производили путем титрования на перевиваемой культуре клеток 3-КГ и ЯДК-04 соответственно. Сущность титрования основана на цитопатическом действии вируса оспы овец, разведенного десятикратным шагом в соответствующей культуре клеток. В качестве контроля служили 4 пробирки с незараженной культурой клеток с ростовой средой, 4 пробирки с незараженной культурой клеток со сменой поддерживающей среды. Культуру клеток в пробирках инкубировали в термостате при $+37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Учет реакции проводили путем микроскопирования монослоя клеток ежедневно через равные интервалы времени в течение 9-11 дней после постановки реакции с целью определения цитопатических изменений в клетках. Результаты титрования считали достоверными при сохранении клеточного монослоя в контролях (таблица-2).

Разведение вируса	Результаты учета ЦПД в культуре клеток				Отношение сработавших к интактным
10^{-1}	+	+	+	+	1,0
10^{-2}	+	+	+	+	1,0
10^{-3}	+	+	+	+	1,0
10^{-4}	+	+	+	-	0,75
10^{-5}	+	-	-	-	0,25
10^{-6}	-	-	-	-	0

Таблица 2 – Протокол итогового титрования вируса оспы овец, накопленного в культуре клеток 3-КГ (+ срабатывание вируса на 50% и более)

Из таблицы 2 видно, что титр инфекционной активности ВОО, накопленный на культуре клеток 3-КГ составил $5,2 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$

Титром инфекционной активности вируса считается вычисленное наибольшее его разведение, вызывающее гибель 50% клеток от числа всех зараженных. Расчет титра вируса производили по методу Кербера в модификации Ашмарина, и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50} / 0,2 \text{ см}^3$ или $\lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$.

Полученные данные в последующем были использованы в расчетах дозы заражения и отработки оптимальных параметров накопления вирусного материала.

Множественность заражения клеточной культуры вирусом оспы овец подбиралась в диапазоне 0,01, 0,1, 0,5 и 1,0 $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$. На каждую комбинацию дозы использовали по 5 пластиковых флаконов объемом 100 мл, которые замораживали на разных сроках инкубации вируса в культуре клеток. В опыте использовали вирус с известной инфекционной активностью $5,2 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$, полученный в опыте по адаптации для пересчета доза заражения.

После заражения культур клеток вирусом, через 24, 48, 72, 96 и 120 часов культивирования, замораживали вирусосодержащий материал для последующего определения титра инфекционной активности вируса, фиксируя степень поражения клеточного монослоя в % во временном интервале (таблица-3).

№ группы	Множественность заражения, $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$	Количество клеток, млн.кл	Срок культивирования вируса с клетками, часы				
			24	48	72	96	120
			титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$				
1-я	0,01	$34 \pm 2,6$	-	1,5	2,75	3,5	4,0
2-я	0,1	$34 \pm 2,6$	1,5	2,75	5,25	6,0	4,5
3-я	0,5	$34 \pm 2,6$	2,0	3,25	5,75	5,5	5,0
4-я	1,0	$34 \pm 2,6$	2,3	2,5	3,75	4,75	4,0
Контр.	-	$34 \pm 2,6$	-	-	-	-	-

Таблица 3 – Динамика накопления вируса оспы овец в культуре клеток 3-КГ при заражении на сформированный монослой

Как видно из таблицы 3, вирусосодержащую культуральную жидкость с максимальным инфекционным титром ($5,5-6,0 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{см}^3$) получали при заражении культуры клеток в дозах 0,1-0,5 $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$. При этом время инкубации составляло 72-96 часов. Заражение более низкой дозой (0,01 $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$) не вело к достаточному накоплению инфекционной активности полученного вирусосодержащего материала даже к 120 часам инкубации.

Таким образом, было определено, что заражающая доза ВОО должна находиться в диапазоне 0,1-0,5 $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$, и полное поражение монослоя (85-100%) культуры клеток происходит к 72-96 часам.

Аналогичная динамика накопления ВОО была получена на культуре клеток ЯДК-04 – (множественность заражения 0,01 $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$ не использовали в связи с ее неэффективностью в предыдущих опытах). Для расчета среднего количества клеток культуры в матрасе РУ провели трипсинизацию клеток и их подсчет по общепринятой методике – средний выход составил $30 \pm 4,1$ млн. кл с матраса (таблица 4).

№ группы	Множественность заражения, $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$	Количество клеток, млн.кл	Срок культивирования вируса с клетками, часы				
			24	48	72	96	120
			титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50} / \text{мл}$				
1-я	0,1	$30 \pm 4,1$	-	2,5	5,0	5,75	4,25
2-я	0,5	$30 \pm 4,1$	2,0	3,5	5,25	5,5	4,5
3-я	1,0	$30 \pm 4,1$	2,3	2,5	3,5	4,25	3,75
Контр.	-	$30 \pm 4,1$	-	-	-	-	-

Таблица 4 – Динамика накопления вируса оспы овец в культуре клеток ЯДК-04 (заражение на сформированный монослой)

Как видно из таблицы 4, максимальное накопление ВОО также было при множественности заражения 0,1-0,5 $\text{ТЦД}_{50} / \text{кл}$. со сроком инкубации 72-96 ч. Следует отметить, что в среднем

накопление ВОО на линии ЯДК-04 было на 0,25-0,75 lg меньше, чем на культуре 3-КГ, что может быть связано как с меньшей чувствительностью так и с меньшим количеством клеток при инфицировании.

Накопление ВОО по методике с заражением на растущую клетку проводили при одновременном внесении клеточной суспензии на ростовой питательной среде и вируса оспы. Как и в предыдущих опытах, на каждую комбинацию дозы заражения использовали по 5 пластиковых флаконов объемом 100 мл, которые замораживали на разных сроках инкубации вируса в культуре клеток. При этом определяли следующие параметры: множественность заражения посевным вирусом (ТЦД₅₀/кл), срок инкубации материала (ч), процент поражения клеточного монослоя во временном интервале, активность полученного вакцинного вируса. В опытах использовали посевную концентрацию клеток 200 тыс.кл/мл (1-я группа), 250 тыс.кл/мл (2-я группа), 300 тыс.кл/мл (3-я группа). В каждой из групп - по 3 варианта множественности заражения - 0,1, 0,5 и 1,0 ТЦД₅₀/кл.

Инфекционную активность полученного в каждом опыте вирусного материала определяли методом титрации на культуре клеток пробирочным методом на сформированный монослой по вышеописанной методике.

Определение методики накопления вируса оспы при заражении клетки на суспензию отработывали на перевиваемой линии клеток ЯДК-04 (таблица - 5).

№ группы	Множественность заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Количество клеток, млн.кл/мат.	Срок культивирования вируса с клетками, часы				
			24	48	72	96	120
			титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³				
1-я	0,1	30±5,0	2,0	2,5	2,8	3,0	3,25
1-я	0,5	30±5,0	1,25	1,5	1,7	2,3	2,5
1-я	1,0	30±5,0	1,5	2,5	3,25	2,8	2,25
2-я	0,1	40±5,0	1,2	1,4	2,0	3,3	3,75
2-я	0,5	40±5,0	1,5	2,2	2,3	3,5	3,0
2-я	1,0	40±5,0	1,8	2,0	2,5	3,25	4,0
3-я	0,1	50±5,0	1,5	2,3	3,25	4,25	5,25
3-я	0,5	50±5,0	1,3	2,25	3,75	5,0	4,75
3-я	1,0	50±5,0	1,6	1,8	3,4	3,7	
Контр. 1-я	-	30±5,0	-	-	-	-	-
Контр. 2-я	-	40±5,0	-	-	-	-	-
Контр. 3-я	-	50±5,0	-	-	-	-	-

Таблица 5 – Динамика накопления вируса оспы овец в культуре клеток ЯДК-04 при заражении на суспензию клеток

Из таблицы 5 видно, что наилучшие результаты были получены при заражении вирусом оспы в суспензию при максимальной концентрации клеток 300 тыс.кл/мл (3-я группа) и при множественности 0,1-0,5 ТЦД₅₀/кл., при этом титр инфекционной активности вируса составил 5,0-5,25lg ТЦД₅₀/см³. При более низких посевных концентрациях клеток накопление вируса было на 0,5-1,5 lg ниже. В то же время при высокой посевной концентрации 300 тыс.кл/мл и множественности заражения 1,0 ТЦД₅₀/кл. накопление было не высоким из-за быстрого срабатывания вируса в культуре клеток. В сравнении с накоплением клеток на сформированный монослой при внесении вируса в суспензию клеток получали активность на 0,5-1,0 lg меньше.

На основании проведенных исследований можно отметить, что наиболее перспективной является методика заражения клеток на полный сформированный монослой со сменой ростовой питательной среды на поддерживающую. Вирусосодержащую культуральную жидкость с максимальным инфекционным титром 5,5-6,0 ТЦД₅₀/см³ получали при

заражении культуры клеток в дозах 0,1-0,5 ТЦД₅₀ /кл., при этом время инкубации составляло 72-96 часов.

Инфекционную активность полученного в каждом опыте вирусного материала определяли методом титрации на культуре клеток З-КГ и ЯДК-04 в пробирках по вышеописанной методике и в микропланшетах (сравнительные парные опыты).

Для определения титра вируса оспы овец в микропланшетах на культуре клеток З-КГ и ЯДК-04 готовили последовательные десятикратные разведения вируса оспы от 10⁻¹ до 10⁻⁶ в 24-луночной планшете. В качестве контроля служили 4 лунки планшета, в которые вносили по 0,1 см³ суспензии клеток З-КГ с концентрацией 180-200 тыс.кл./см³ (для ЯДК – 200-230 тыс.кл./см³) и 0,05 см³ поддерживающей среды. Планшеты инкубировали в СО₂-инкубаторе при +37,0 ± 1,0⁰ С и 5% СО₂.

Учет реакции проводили путем микроскопирования монослоя клеток ежедневно через равные интервалы времени в течение 9-11 дней после постановки реакции с целью определения цитопатических изменений в клетках. Результаты титрования считали достоверными при сохранении клеточного монослоя в контролях (таблица -6).

Разведение вируса	Результаты учета ЦПД в культуре клеток				Отношение сработавших к интактным
10 ⁻¹	+	+	+	+	1,0
10 ⁻²	+	+	+	+	1,0
10 ⁻³	+	+	+	+	1,0
10 ⁻⁴	+	+	-	-	0,5
10 ⁻⁵	+	-	-	-	0,25
10 ⁻⁶	-	-	-	-	0

Таблица 6 – Протокол итогового титрования вируса оспы овец накопленного в культуре клеток ЯДК-04 методом микротитрации в планшетах (+ срабатывание вируса на 50% и более)

Расчет титра вируса производили по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lgТЦД₅₀ /0,05 мл или lgТЦД₅₀ /мл.

Титр инфекционной активности ВОО накопленный на культуре клеток ЗЯДК-04 составил 5,55 lg ТЦД₅₀ /см³.

Анализ результатов определения инфекционной активности вируса оспы проведенных пробирочным и микропланшетным методами, при пересчете на 1,0 мл (ТЦД₅₀ /мл) вирусной биомассы, показал сопоставимость получаемых данных с расхождением на +0,1-0,5 lg (+0,25) в сторону микропланшетного метода (n=7), что свидетельствует о его более высокой чувствительности и точности. Построение корреляционных кривых и расчёт статистического отклонения показал достоверность данных титрования двумя методами относительно заданного уровня значимости (P=0,05).

Заключение. В течение 4-х последовательных слепых пассажей проведена адаптация вируса оспы овец штамм «НИСХИ» к перевиваемым культурам клеток З-КГ, ЯДК-04 и ПО-2, которые прошли депонирования в лабораторной коллекции. Титр вируса оспы овец на культуре клеток ЯДК-04 составил 5,45 ± 0,25 lg, на линии З-КГ - 5,75 ± 0,25 lg, на культуре ПО-2 - 5,0 ± 0,25 lg (n=3). В то же время культивирование вируса в линии ПО-2 на эмбриональной сыворотке крови показало результаты сравнительные с накоплением в линиях З-КГ и ЯДК-04.

1. Отработана технология накопления вируса оспы овец штамм «НИСХИ». Наилучшие результаты получены при заражении вирусом оспы на полный сформированный монослой, при этом инфекционный титр составил 5,0-5,75 lg ТЦД₅₀ /см³ на линии ЯДК и 5,5-6,0 lg ТЦД₅₀ /см³ на З-КГ, при множественности заражения 0,1-0,5 ТЦД₅₀ /кл., время инкубации составляло 72-96 часов.

3. Анализ результатов определения инфекционной активности вируса оспы, проведенных пробирочным и микропланшетным методами, при пересчете на 1,0 мл (ТЦД₅₀ /мл) вирусной биомассы, показал сопоставимость получаемых данных с расхождением на +0,1-0,5 lg (+0,25) в сторону микропланшетного метода (n=7), что свидетельствует о его более высокой чувствительности и точности.

Список литературы

- 1 Бакулов И.А. Эпизоотология с микробиологией. – М.: «Агропромиздат», 1987. - 415 с.
- 2 Дмитриев А.Ф., Дорофеев В.И., Дегтярев В.И. Особенности эпизоотического процесса оспы овец в Ставропольском крае// Вестник ветеринарии - 1999. №3. - С. 68-70.
- 3 Лихачев Н.В. Оспа овец и коз. – М.: «Колос», 1993. - 105 с.
- 4 Нургазиев Р.З., Акматова Г.К., Иманов Э.Д. О распространенности оспы овец и мерах борьбы с нею в некоторых странах мира// Мониторинг распространения и предотвращения особо опасных болезней животных: Тезисы докладов Международной конференции. –Ташкент, 2004.- С.131-133
- 5 Бальшев В.М., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф. Разработка и использование вирусвакцины против оспы овец сухой культуральной// Производство и контроль медицинских ветеринарных препаратов, опыт применения и реализации их в странах СНГ: Тезисы докладов конференции. – Вольгинский, 1999. - 22 с.
- 6 Бакулов И.А., Книзе А.В., Котляров В.М. Система мониторинга особо опасных, экзотических и малоизученных, в том числе зооантропонозных болезней животных. – М.: «Агропромиздат», 2001. - 72 с.
- 7 Кузнецов А.Ф. Справочник ветеринарного врача. – М.: «Лань», 2002. - 896 с.
- 8 Достоевский П.П., Судаков Н.А., Атамась В.А. Справочник ветеринарного врача. – К.: «Урожай», 1990. - 784 с.
- 9 Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М.: «Колос», 1998. - 928 с.
- 10 Жавненко В.М. Практикум по вирусологии. – Минск.: «Дизайн», 1998. - 144 с.
- 11 Госманов Р.Г., Колычев Н.М. Ветеринарная вирусология. – М.: «Колос», 2006. - 288 с.

К.Н. Жасланова¹, Г.М. Салхожаева², Ж.А. Рахимжанова³, М.К. Тыныкулов⁴, И. А. Пунтус⁵, К.М. Уразов⁶

¹⁵⁶ «Biotron Group» ЖШС, Степногор, Қазақстан

²³⁴ Биотехнология және микробиология кафедрасы, Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан

Қой шешегі вирусының жинақталу технологиясын өңдеу

Аңдатпа Мақалада 3-КГ, ЯДК-04 және ПО-2 қорытылатын жасуша культураларында қой шешегі штамм вирусын бейімдеу және қолайлы параметрлерді өңдеу нәтижелері көрсетілген. Қой шешек вирусын жұқтыру барысында инфекциялық белсенділігі қалыптасқан моноқабатта ЯДК линиясында 5,0-5,75 lg ТЦД₅₀/см³, КГ - 5,5-6,0 lg ТЦД₅₀/см³, ал бірнеше мәрте жұқтыру кезінде 0,1-0,5 ТЦД₅₀/кл, инкубациялау мерзімі 72-96 сағатты құрады. Вирустың жұқпалы титрін анықтау тәсілінің пробирикалық және микропланшетті әдістері өңделді, корреляциялық талдау жүргізілді. Шешек вирусының инфекциялық белсенділігін анықтау нәтижелерін талдау алынған деректердің +0,1-0,5 lg (+0,25) микротолқынды әдіс жағына қарай (n=7) ауытқумен салыстырмалылығын көрсетті, бұл оның аса жоғары сезімталдығы мен дәлдігін көрсетеді.

Түйін сөздер: қой шешек вирусы, вакцина, штамм, культура, титр, моноқабат, инкубация, инфекция.

К.Н. Zhaslanova¹, G.M. Salkhozhayeva², Zh.A. Rakhimzhanova³, M.K. Tynykulov⁴, I.A. Puntus⁵, K.M. Urazov⁶

¹⁵⁶ LLP “Biotron Group” Stepnogorsk, Kazakhstan

²³⁴ Department of Microbiology and Biotechnology of L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

Testing the process of accumulation of the virus sheep pox

Abstract: The article presents the results of adaptation and development of optimal parameters of accumulation of sheep pox virus strain on the transplanted cell cultures 3-KG, YADK-04 and PO-2. Infectious activity in case of infection with VSP on a complete formed monolayer was 5.0-5.75 lg TCD₅₀/cm³ on the YADK line and 5.5-6.0 lg TCD₅₀/cm³ on 3-KG, with a plurality of infection 0.1-0.5 TCD₅₀/CL., incubation time was 72-96 hours. The method of determining the infectious titer of the virus by test-tube and microplate methods is worked out, the correlation analysis is carried out. Analysis of the results of determining the infectious activity of the smallpox virus showed comparability of the data with a discrepancy of + 0,1-0,5 lg (+0,25) towards the microplate method (n=7), which indicates its higher sensitivity and accuracy.

Keywords: sheep pox virus, vaccine, strain, culture, titer, monolayer, incubation, infection.

References

- 1 Bakulov I.A. Ehpizootologiya s mikrobiologiej [Epizootology with Microbiology], (Agropromizdat, Moscow, 1987).
- 2 Dmitriev A.F., Dorofeev V.I., Degtyarev V.I. Osobennosti ehpizooticheskogo processa ospy ovec v Stavropol'skom krae [Peculiarities of epizootic process of smallpox of sheep in the Stavropol territory] Vestnik veterinarii, j[ournal of veterinary medicine], 4(3), 68–70 (1999).
- 3 Lihachev N.V. Ospa ovec i koz [Smallpox of sheep and goats], (Kolos, Moscow, 1993).
- 4 Nurgaziev R.Z., Akmatova G.K., Imanov E.D. O rasprostranennosti ospy ovec i merah bor'by s neyu v nekotoryh stranah mira monitoring rasprostraneniya i predotvrashcheniya osobo opasnyh boleznej zhivotnyh [On the prevalence of sheep smallpox and measures to combat it in some countries of the world monitoring the spread and

- prevention of particularly dangerous animal diseases]. Tezisy dokladov Mezhdunarodnoj konferencii [Abstracts of the international conference]. Samarkand, 2004, pp. 131-133.
- 5 Balyshev V.M., ZHesterev V.I., Gorshkova T.F. Razrabotka i ispol'zovanie virusvacciny protiv ospy ovec suhoj kul'tural'noj proizvodstvo i kontrol' medicinskih veterinarnyh preparatov, opyt primeneniya i realizacii ih v stranah SNG [Development and use of virus vaccine against sheep smallpox dry cultural] [Production and control of veterinary drugs, experience of their application and implementation in the CIS countries] Tezisy dokladov konferencii [Abstracts of the conference] Vol'ginskij, 1999, pp. 22.
 - 6 Bakulov I.A., Knize A.V., Kotlyarov V.M. Sistema monitoringa osobo opasnyh, ehkzoticheskikh i maloizuchennyh, v tom chisle zooantroponoznyh boleznej zhivotnyh [Monitoring system of especially dangerous, exotic and little-studied, including zoonanthropous animal diseases], (Agropromizdat, Moscow, 2001).
 - 7 Kuznecov A.F. Spravochnik veterinarnogo vracha [Manual of a veterinary], (Lan, Moscow, 2002).
 - 8 Dostoevskij P.P., Sudakov N.A., Atamas V.A. Spravochnik veterinarnogo vracha [Manual of a veterinary], (Urozhaj, Moscow, 1990).
 - 9 Syurin V.N., Samujlenko A.YA., Solov'ev B.V., Fomina N.V. Virusnye bolezni zhivotnyh [Viral diseases of animals], (Kolos, Moscow, 1998).
 - 10 ZHavnenko V.M. Praktikum po virusologii [Workshop on virology], (Dizajn, Minsk, 1998).
 - 11 Gosmanov R.G., Kolychev N.M. Veterinarnaya virusologiya [Veterinary Virology], (Kolos, Moscow, 2006).

Сведения об авторах:

- Жасланова К.Н.* – вирусолог ТОО «Biotron Group», Пром. зона 4, корпус 7, Степногорск, Қазақстан.
Салхожаева Г.М. – кандидат биологических наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Мунайтпасова, 13, Астана, Қазақстан.
Рахимжанова Ж.А. - кандидат биологических наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Мунайтпасова, 13, Астана, Қазақстан.
Тыныкулов М.К. - кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель, Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Мунайтпасова, 13, Астана, Қазақстан.
Пунтус И.А. – заведующий лабораторией культур клеток ТОО «Biotron Group», Пром. зона 4, корпус 7, Степногорск, Қазақстан.
Уразов Қ. М. – старший вирусолог ТОО «Biotron Group», Пром. зона 4, корпус 7, Степногорск, Қазақстан.
- Zhaslanova K.N.* – "Biotron Group" LLP, virologist, Ind. zone 4, building 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.
Salkhzhayeva G. M. – Candidate of biological Sciences, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, Munaytpasov 13, building №3, cab. 234, Astana, Kazakhstan.
Rahimzhanova F. A. - candidate of biological sciences, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, Munaytpasov 13, building №3, cab. 234, Astana, Kazakhstan.
Tynikulov M. K. - Candidate of agricultural Sciences, Senior lecturer, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan, Munaytpasov 13, building №3, cab. 234, Astana, Kazakhstan.
Puntus I. A. – "Biotron Group" LLP, head of the laboratory of Cell cultures, Ind. zone 4, building 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.
Urazov. K.M. – "Biotron Group" LLP, senior virologist, Ind. zone 4, building 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Поступила в редакцию 14.01.2019