

ПИВОВА Елена Юрьевна

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА ЗАРАЗНОГО УЗЕЛКОВОГО
ДЕРМАТИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, АДАПТИРОВАННОГО
К ПЕРЕВИВАЕМЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК**

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ).

Научный руководитель:

Живодёров Сергей Петрович
кандидат ветеринарных наук

Официальные оппоненты:

Агольцов Валерий Александрович
доктор ветеринарных наук, ФГБОУ ВО
«Саратовский государственный
аграрный университет имени Н.И.
Вавилова», профессор кафедры
«Болезни животных и ветеринарно-
санитарная экспертиза»;

Кононов Александр Владимирович
кандидат ветеринарных наук, ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья
и животных», начальник отдела
биотехнологий и конструирования
вирусных и бактериальных препаратов

Ведущая организация:

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
«Сибирский федеральный научный
центр агробiotехнологий Российской
академии наук»

Защита состоится «__» _____ 2022 г. в __ часов на заседании диссертационного совета 36,1.002.01 (Д220.015.01) при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <https://www.arriah.ru> ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» г. Владимир

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова
Татьяна Валентиновна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота (ЗУД КРС) - контагиозная инфекционная болезнь, которая характеризуется персистентной лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узлов (бугорков), поражением глаз и слизистых оболочек органов дыхания и пищеварения (Мищенко, А.В., 2015., Косарева, О. А., 2011., Turpurainen, E., 2017).

В последние десятилетия инфекция заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота распространяется в северном и восточном направлениях от Африки. В РФ болезнь впервые зарегистрирована в 2015 году на территории Республики Дагестан, откуда в дальнейшем распространилась по регионам Северо-Кавказского и Южного ФО (Кононов, А.В., 2017). ЗУД КРС относится к категории особо опасных трансмиссивных болезней животных, подлежащих обязательной нотификации в Международное Эпизоотическое Бюро (МЭБ). Приказом Минсельхоза РФ от 9 марта 2011 г. N 62 заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота внесен в «Перечень заразных и иных болезней животных».

Одним из ключевых аспектов борьбы и контроля ЗУД КРС, является профилактика и своевременная, и точная диагностика болезни (Turpurainen, E., 2017).

Диагноз на ЗУД КРС ставят на основании эпизоотологических и клинических данных, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований. Методология постановки диагноза включает обнаружение специфических антител или антигена методом иммуноферментного анализа (ИФА), идентификацию генома вируса ЗУД КРС с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и выделение вируса из биологического материала от животных культуральными методами (Рябикина, О.А., 2015).

Вирусосодержащий материал, полученный в чувствительных линиях клеток, широко применяется при изучении биологических свойств и молекулярно-генетических характеристик вируса. Для успешного выделения и идентификации вируса ЗУД КРС большое значение имеет соблюдение схемы культивирования возбудителя. Перспективными для культивирования вируса ЗУД КРС являются перевиваемые линии клеток, обеспечивающие получение вирусосодержащего материала в больших объемах (Рябикина, О.А., 2015). Вирусосодержащий материал, полученный в перевиваемых линиях клеток, широко применяется при изучении биологических свойств и молекулярно-генетических характеристик вируса.

Однако, данные о методах выделения и оптимизации параметров культивирования вируса ЗУД КРС и восприимчивости к нему лабораторных животных малоизучены.

В связи с изложенным, исследования по адаптации выделенного в Российской Федерации вируса ЗУД к перевиваемым культурам клеток различного происхождения и изучение его биологических свойств являются актуальными.

Степень разработанности проблемы. В исследованиях зарубежных и отечественных ученых показана возможность размножения вируса ЗУД КРС в перевиваемых культурах клеток различного происхождения (Plowright, W., 1959, Шумилова, И. Н., 2018, Заерко, В., 2018). Интерес по адаптации вируса ЗУД к перевиваемым и первичным культурам клеток обусловлен возможностью длительности поддержания его в лабораторных условиях, относительной однородностью популяции и стабильностью биологических свойств. Описаны штаммы вируса ЗУД КРС, адаптированные к перевиваемым культурам клеток Vero, ЯДК, ПО и к др. клеточным линиям (Шумилова, И. Н., 2018). В тоже время на начало проведения наших исследований выделенного и адаптированного к перевиваемым линиям клеток изолята «Волгоградский» вируса ЗУД КРС, не было. Полученные новые данные принесут фундаментальные знания, и будут иметь важное прикладное значение.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы являлось изучение биологических свойств вируса ЗУД КРС, адаптированного к перевиваемым культурам клеток.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить чувствительность клеточных культур и степень их перmissивности к изоляту «Волгоградский» вируса ЗУД КРС;
2. Провести адаптацию вируса ЗУД КРС, выделенного в Российской Федерации, к перевиваемым линиям клеток гомологичного и гетерологичного происхождения;
3. Оработать оптимальные параметры культивирования вируса ЗУД КРС, адаптированного к перевиваемым линиям клеток;
4. Изучить восприимчивость лабораторных животных к изоляту «Волгоградский» вируса ЗУД КРС при их экспериментальном заражении;
5. Изучить эффективность метода иммуноцитохимического анализа (ИЦХ ИФА) и динамику выявления антигенов вируса заразного узелкового дерматита в перевиваемой перmissивной культуре клеток;

6. Депонировать штамм «Волгоградский» вируса ЗУД КРС в государственную коллекцию микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ.

Научная новизна результатов исследований. В результате проведенных исследований на территории РФ в Волгоградской области в 2016 г. выделен вирус ЗУД КРС, получен штамм «Волгоградский», который депонирован в ГКМ ФИЦВиМ под регистрационным номером– «3192».

Определены оптимальные параметры культивирования антигенов вируса заразного узелкового дерматита в наиболее чувствительных линиях клеток (ПО, Vero, RK-13).

Изучена восприимчивость лабораторных животных к выделенному изоляту «Волгоградский» вируса ЗУД КРС.

Впервые выявлено, что вирус ЗУД КРС размножается в перевиваемых клетках диких животных КЭЛ/07 (кожа эмбриона лося) и ЛЭО (легкое эмбриона лося) с инфекционной активностью 5,0-5,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Изучена динамика выявления антигенов вируса ЗУД КРС и их локализация в клетках инфицированной культуры в течение первых 10-24 часов культивирования после заражения методом ИЦХ ИФА на основе специфических гипериммунных сывороток.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выделенный на территории Российской Федерации в Волгоградской области изолят вируса ЗУД КРС депонирован в ГКМ ФИЦВиМ, как штамм «Волгоградский» и, может быть, использован при проведении НИР. Разработаны «Методические положения по адаптации вируса заразного узелкового дерматита к перевиваемым линиям клеток», которые рассмотрены на ученом совете, утверждены директором ФГБНУ ФИЦВиМ от 16.01.2020 г.

Методология и методы исследования. В работе использовали методы культивирования первичных и перевиваемых культур клеток, вирусологические, серологические, иммунохимические, молекулярно – генетические методы и статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту:

Культуральные свойства исходного и адаптированного к культурам клеток изолята «Волгоградский» вируса ЗУД КРС.

Результаты применения метода ИЦХ ИФА для выявления антигенов вируса ЗУД КРС и их локализацию в клетках инфицированной культуры в течение первых 10–24 после инфицирования.

Результаты изучения восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС изолята «Волгоградский» при их экспериментальном заражении.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы исследований выполнены при консультативной и методической помощи научных сотрудников: В.И. Балышевой, О.В. Капустиной, С.Г. Юркова, В.М. Балышева, А.В. Луницина, О.Л. Колбасовой, за что автор выражает им глубокую признательность.

Степень достоверности и апробации результатов. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ФГБНУ ФИЦВиМ, при защите научно-квалификационной работы на Государственной итоговой аттестации по окончании аспирантуры, на Международной научно-практической конференции «Новое слово в науке и практике» ИГСХА им. акад. Д.К. Беляева (г. Иваново, 2018 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки для докторских и кандидатских диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах текста и содержит: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, приложения; иллюстрирована 12 таблицами и 17 рисунками. Список литературы включает 137 источников, из которых 100 – иностранные.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы

Вирус. В работе использовали изолят вируса ЗУД КРС, выделенного на территории РФ Волгоградской области в 2016 г. от вынужденно убитых быков калмыцкой породы.

Животные. В работе были использованы аутбредные мыши живой массой 15–20 г, сирийские хомячки живой массой 40–60 г, морские свинки живой массой 600–1200 г и кролики живой массой 2,5 – 3 кг.

Культуры клеток. Перевиваемые культуры клеток: кожа эмбриона лося (КЭЛ/07), легкое эмбриона лося (ЛЭО), почки африканской зеленой мартышки (Vero), почки обезьяны (CV – 1), (перевиваемые линии клеток почки овцы (ПО (ВНИИВиМ)), почки кролика (РК-13/2-03), почки теленка (Taurus-1), почки теленка (MDBK). Первичная культура клеток: тестикулы козленка (ТК).

Культуры клеток, питательные среды для культивирования клеток и вируса, растворы, сыворотки, реактивы и бактериальные питательные среды получали из лаборатории «Лекарственных средств для животных» ФГБНУ ФИЦВиМ.

Оборудование и расходные материалы. В работе использовали холодильники низкотемпературные и CO₂ инкубаторы (Sanio); микроскоп инвертированный СК-2 (Olympus); микроскоп инвертированный люминесцентный (Nikon); шкаф ламинарный с вертикальным потоком воздуха II класса защиты (Bellco Glass); термостаты электрические и холодильники бытовые отечественные; флаконы пластиковые и микропланшеты культуральные, а также другое оборудование и расходные материалы.

2.2 Методы исследований

Выделение вируса ЗУД в культуре клеток. Материалом для исследований при выделении вируса ЗУД КРС культурах клеток являлись пробы патологического материала животных (легкие, селезенка, лимфатические узлы, подкожная клетчатка). Из проб готовили 10 % суспензию в среде Игла MEM с добавлением антибиотиков. После осветления центрифугированием при 2000 об/мин вирусодержащую суспензию использовали для заражения культур клеток.

Культивирование вируса ЗУД КРС, получение и титрование вирусодержащего материала. Культивирование вируса осуществляли при множественности заражения 0,1-0,01 ТЦД₅₀/кл в 1-2 суточных культурах клеток с адсорбцией вируса в течение 60 мин при температуре (37,0±0,5) °С. После этого вносили поддерживающую среду Игла MEM, содержащую 2 % фетальной сыворотки КРС. Инфицированную культуру клеток инкубировали при температуре (37,0±0,5) °С в течение 5-7 дней. Затем клетки и культуральную жидкость замораживали при температуре минус (40,0±0,5) °С. При проведении следующего пассажа размороженную вирусодержащую суспензию вносили в культуру клеток.

Инфекционную активность вируса ЗУД определяли титрованием в 1 – 2 суточных первичных и перевиваемых линиях клеток, титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Заражение лабораторных животных. Для изучения восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС, вирусодержащий материал вводили внутрикожно, подкожно, интраназально и внутривенно. Для инокуляции использовали культуральный материал 15 пассажа в культуре клеток ПО с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦД₅₀/см³. Для каждого вида лабораторных животных использовали контрольную группу. За животными вели ежедневные наблюдения, контролируя их клиническое состояние, включая развитие кожных

узелков в местах инокуляции. Эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие животных проводили по общепринятой методике.

Определение наличия и уровня вируснейтрализующих антител к вирусу ЗУД в сыворотках крови животных. Определение наличия антител против вируса заразного узелкового дерматита, осуществляли коммерческим диагностическим набором IDVET, ID Screen® Capripox Double Antigen Multi-species согласно инструкции производителя. Вируснейтрализующую активность сывороток крови лабораторных животных определяли в реакции нейтрализации (РН).

Постановка полимеразной цепной реакции в реальном времени. Выделение нуклеиновых кислот и постановку ПЦР-РВ проводили набором (Интерлабсервис, Россия) согласно инструкции производителя.

Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ. Выделение специфичных продуктов амплификации осуществляли с помощью коммерческого набора «Аху Prep DNA Gel Extraction Kit» согласно инструкции производителя. Секвенирование очищенных амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием набора «BigDye Terminator 3.1» в соответствии с инструкцией производителя. Филогенетическое древо строили по общепринятым для анализа генома методом максимального правдоподобия с использованием программного обеспечения MEGA 6.0.

Постановка метода иммуоцитохимического анализа. При постановке непрямого метода ИЦХ использовали стандартизованную специфическую гипериммунную сыворотку против оспы овец. Монослой клеток, заражали вирусом ЗУД КРС в дозе 0,1–1,0 ТЦД₅₀/кл.

Динамику накопления антигенов вируса ЗУД КРС в процессе его культивирования изучали через 6, 12, 18, 24 и 36 ч инкубирования. Для этого клеточный монослой фиксировали согласно методическим рекомендациям (Ездакова, И.Ю., 2011). В монослое клеток на планшетах изучали окрашенные места специфического взаимодействия антигенов вируса ЗУД КРС с антителами в инфицированных клетках.

Гистологическое исследование патологического материала. Для изучения гистологической картины болезни отбирали некропсийный материал в виде кожных узелков. Исследование окрашенных срезов осуществляли методом оптической микроскопии. Для оценки гистопатологических изменений кожных узелков кроликов использовали криотомные срезы исследуемых патологически измененных нативных образцов кожи. В работе применяли непрямой метод ИГХ

исследований. Для удобной визуализации структурных элементов тканей использовали метод докрасивания ядер клеток гематоксилином Майера.

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами в программе Microsoft Office Excel 2018.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Выделение изолята вируса ЗУД КРС из проб патологического материала в культурах клеток

На этапе для выделения вируса использовали первичную культуру клеток тестикул козленка (ТК), а также перевиваемую линию почки овцы (ПО).

Сосуды инкубировали при температуре $(37,0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ до появления цитопатического действия (ЦПД) вируса более чем в 80% клеток монослоя. Затем вирусную суспензию в культуральных сосудах трехкратно замораживали-оттаивали и после дефростации выполняли следующий пассаж. Таким образом, провели три последовательных пассажа.

В 1-м пассаже изменений в культуре клеток ПО не наблюдали, начиная со 2-го пассажа выявляли незначительные изменения морфологии клеток, их округление. В 3-м пассаже отмечали характерное ЦПД вируса в виде разрыва клеточного монослоя и отделения клеток от подложки, в то время как в контрольной культуре таких изменений не выявляли.

Инфекционная активность вируса на уровне 3-го пассажа составляла $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

В первичной культуре клеток ТК на уровне 3-го пассажа также регистрировали ЦПД вируса, которое проявлялось в округлении клеток, но характер поражения был менее выражен, чем в культуре клеток ПО. Инфекционная активность вируса составляла $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Изолят вируса ЗУД КРС был выделен с использованием как первичной, так и перевиваемой культуры клеток и достигал инфекционных значений в культуре клеток ТК $3,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в культуре клеток ПО $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

3.2. Адаптация вируса ЗУД КРС к перевиваемым и первичным линиям клеток

Для адаптации изолята к перевиваемым линиям клеток и определения чувствительных к нему культур использовали линии гомологичного и гетерологичного происхождения. Перевиваемые линии клеток (КЭЛ/07, MDBK, VERO, CV – 1, ПО, РК-13/2-03) выращивали в культуральных флаконах полезной

площадью 25 см² в среде Игла – МЕМ с добавлением 10,0 % фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота.

В некоторых случаях в биотехнологии возникает необходимость в вирусном сырье, произведенном в гетерологичной клеточной системе. Поскольку не представлялось возможным адаптировать культуральный вирус к гетерологичной клеточной системе РК-13/2-03 прямыми пассажами, применяли смешанную культуру клеток, т.е. культивировали вирус в монослое клеток, состоящем из чувствительных к вирусу клеток и клеток гетерологичного происхождения.

При образовании сформировавшегося клеточного монослоя смешанной культуры клеток РК-13/2-03 и ПО, из культурального флакона удаляли ростовую питательную среду, клетки 1–2 раза промывали средой Игла – МЕМ, для удаления сывороточных антител и ингибиторов.

Затем в каждый культуральный флакон вносили по 1,0 мл культурального вирусосодержащего материала, при этом множественность заражения составляла 0,1-0,01 ТЦД₅₀/кл, проводили адсорбцию вируса при температуре (37,0±0,5) °С в течение 40–60 минут. Затем вносили поддерживающую среду Игла – МЕМ содержащую 2% фетальной сыворотки крови КРС. Инфицированную культуру клеток инкубировали при температуре (37,0±0,5)°С в течение 5-6 дней без смены среды.

Все культуральные флаконы после заражения клеток ежедневно просматривали под микроскопом на наличие цитопатогенного действия. По истечению срока инкубации инфицированную культуру клеток замораживали при температуре минус (40±0,5) °С и оттаивали при комнатной температуре для освобождения вируса.

Следующий пассаж выполняли аналогично описанному выше. Для адаптации вируса провели 15 пассажей в смешанной культуре клеток до появления характерного ЦПД. После этого было проведено еще 30 пассажей в данной культуре клеток.

Адаптацию в других системах культивирования проводили методом серийного пассирования вируса.

Характер и проявление ЦПД в разных культурах клеток был различен и зависел от системы культивирования. Так, в культуре клеток РК-13/2-03 (рисунок 1 {1}) проявление ЦПД вируса было сходным с таковым при его репродукции в культуре клеток ПО (рисунок 1 {2}): через 48 ч после заражения здесь регистрировали формирование тяжей из веретенообразных клеток, а через 72 ч - округление и отслоение инфицированных клеток от подложки с лизисом и

деструкцию клеточного монослоя. В инфицированной культуре Vero (рисунок 1 {3}) наблюдалось нарастающее округление клеток, формирование включений, не свойственных неинфицированным клеткам, с последующим лизисом и отслоением.

При инфицировании перевиваемой культуры КЭЛ/07 и ЛЭО наблюдали аналогичные изменения, где на 2 и 3 сутки отмечали образование веретенообразных клеток и их округление (рисунок 4 {2}), вирус накапливался в титре $5,0-5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

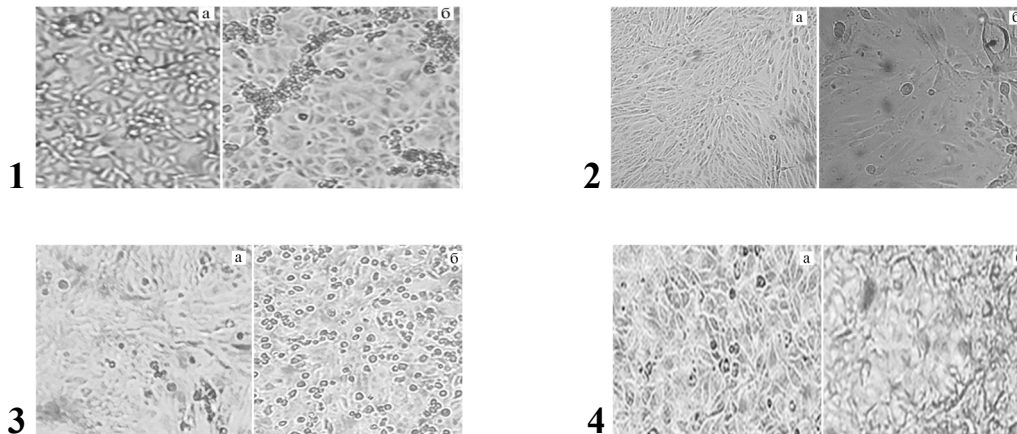


Рисунок 1 - Цитопатическое действие вируса ЗУД КРС в перевиваемых линиях клеток почки кролика РК-13/2-03{1}, кожи эмбриона лося КЭЛ/07{2}, почки африканской зеленой мартышки Vero{3}, почки овцы ПО{4}: а - контрольная культура клеток, б, - культура клеток на 2-е и 3-и сутки (после заражения) (ув. $\times 150$)

Инфекционная активность вируса в этих культуральных системах также различалась (таблица 1).

Таблица 1 – Инфекционная активность вируса ЗУД КРС в различных культурах клеток (n = 3, M \pm m)

Культура клеток	Пассаж	Выявление ЦПД, ч	Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
Гомологичные культуры клеток			
МДВК	4-6	46-48	5,11 \pm 0, 36
КЭЛ/07	4-6	70-72	5,00 \pm 0, 35
ТК	4	120-144	3,92 \pm 0, 37
ПО	4	118-120	4,61 \pm 0, 07
	5-10	72-96	6,11 \pm 0, 13
	11	48-50	6,44 \pm 0, 07
ЛЭО	4-6	70-72	5,00 \pm 0, 35
Гетерологичные культуры клеток			
РК-13/2-03	4-7	48-72	5,23 \pm 0,35
VERO	4-9	46-48	5,03 \pm 0,20
CV-1	4-9	48-72	5,02 \pm 0,35

Последовательное пассирование изолята вируса ЗУД КРС позволило адаптировать его к гомологичным культурам клеток: MDBK, ТК, КЭЛ, ЛЭО, ПО. Максимальное накопление вируса наблюдали в гомологичной культуре клеток ПО, титр составил $6,44 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в гетерологичной RK-13/2-03 достигала $5,23 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Метод смешанного культивирования способствовал адаптации изолята вируса ЗУД КРС к перевиваемой культуре клеток RK-13/2-03 с инфекционной активностью $5,23 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Полученные данные показывают, что данный метод культивирования позволяет эффективно адаптировать вирус ЗУД КРС к гетерологичным культурам клеток.

Для дальнейшего изучения культуральных свойств вируса ЗУД КРС использовали из гомологичных культур культуру клеток ПО, а из гетерологичных Vero и RK-13/2-03.

В гетерологичных культурах клеток Vero и RK-13/2-03 начиная с 4 и до 40 последовательного пассажа, срок наступления ЦПД составлял 48–72 часа, максимальное накопление вируса в процессе пассирования в этих культурах клеток достигало $5,23 \pm 0,35 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

В перевиваемой культуре клеток ПО было проведено 60 последовательных пассажей. Во втором пассаже при культивировании вируса ЗУД КРС наблюдали незначительное округление клеток. Начиная с третьего последовательного пассажа, ЦПД вируса регистрировали на 5 сутки культивирования. Оно характеризовалось появлением веретенообразных клеток с последующим их лизисом и отслоением от подложки. Инфекционная активность составляла $4,61 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В течение последующих 5-10 серийных пассажей сроки наступления ЦПД сократились и наступало через 72-96 часов, а вирус стал накапливаться в титре $6,11 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. На уровне одиннадцатого пассажа динамика развития ЦПД вируса была более интенсивной. Время появления ЦПД вируса составляла 48 часов с момента заражения клеток, титр вируса был равен $6,44 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В период с 11 до 15 последовательного пассажа характер ЦПД вируса не изменялся и проявлялся в виде округления клеток, отслоения клеток от субстрата с последующей деструкцией. Инфекционная активность составляла $5,92 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Вирус культивировали в течение 5 суток после заражения. Начиная с 15 пассажа, титр вируса варьировал в пределах $5,5-6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, и оставался в этом диапазоне до 60 пассажа.

При проведении секвенирования фрагмента гена LSDV 011 изолята «Волгоградский» ДНК из двух последовательных пассажей вируса (15 и 60

пассажные уровни в клеточной линии ПО) нами были получены нуклеотидные последовательности и проведён их сравнительный анализ с сиквенсом изолята «Neethling», доступного в открытой базе данных «GenBank». Анализ полученных нуклеотидных последовательностей не выявил никаких изменений и, таким образом, данные последовательности являлись идентичными.

3.3 Определение оптимальной множественности заражения культур клеток RK-13/2-03 и ПО вирусом ЗУД КРС

С целью оптимизации условий культивирования вируса в перевиваемых линиях клеток Vero, RK-13/2-03 и ПО определяли оптимальную множественность заражения.

Культуры клеток инфицировали вирусом ЗУД КРС, разными дозами (0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001 ТЦД₅₀/кл). Для заражения использовали вирус ЗУД КРС, прошедший 15 пассажей в культуре клеток ПО с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦД₅₀/см³. Длительность культивирования зависела от проявления полной деструкции инфицированного клеточного монослоя. Культуру клеток инкубировали при температуре (37,0±0,5) °С до полной деструкции клеточного монослоя.

При множественности заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл инфекционная активность в культурах клеток ПО и Vero составляла: 4,50±0,21 lg ТЦД₅₀/см³, а в RK-13/2-03 4,50±0,17 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно. При множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл. в исследуемых клеточных системах вирус накапливался в ПО – 5,0±0,19 lg ТЦД₅₀/см³, RK-13/2-03 – 4,77±0,08 lg ТЦД₅₀/см³ и Vero – 4,61±0,07 lg ТЦД₅₀/см³. При данных дозах ЦПД проявлялось через 48 часов инкубирования. После заражения в дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл. регистрировали повышение титра вируса до 5,5 ±0,00 lg ТЦД₅₀/см³ в культуре клеток ПО, а в культурах клеток Vero и RK-13/2-03 до 5,0±0,15 и 5,08±0,13 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. Кроме того, при использовании данной множественности заражения сокращалось время культивирования вируса на 1–2 суток. В дозах 0,0001 и 0,00001 ТЦД₅₀/кл. отмечалась медленная «работа вируса». Так, деструкция клеточного монослоя наступала через 9, 11 и 13 суток для культур клеток ПО, Vero, RK-13/2-03.

Оптимальными заражающими дозами для культивирования вируса ЗУД КРС в клеточных системах ПО, Vero и RK-13/2-03 являются 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл, при которых вирус накапливается в максимальных титрах 5,0– 5,5 lg ТЦД₅₀/см³.

3.4 Влияние концентрации сыворотки крови на накопление вируса ЗУД КРС

Для оптимизации содержания фетальной сыворотки КРС в поддерживающей среде клетки ПО и VERO, инфицированные вирусосодержащей суспензией 15 пассажа с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в дозе $0,001 \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, инкубировали в среде без сыворотки и при добавлении 2, 5 и 10 % сыворотки КРС. Динамика развития ЦПД была более интенсивной в культуре клеток, культивируемой в присутствии 2 и 5 % фетальной сыворотки крови КРС. Наибольший титр вируса наблюдали при 2-5 % сыворотки КРС в культуре клеток ПО – $5,41 \pm 0,11 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ по сравнению в среде с 10 % сыворотки $5,23 \pm 0,10 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и в бессывороточной среде $4,0 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В культуре клеток VERO в среде с 2-5 % сыворотки – $5,08 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в бессывороточной среде и среде с 10 % сыворотки – $3,78 \pm 0,33$ и $4,74 \pm 0,04 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Следовательно, оптимальным содержанием сыворотки КРС в поддерживающей среде является 2–5 %.

3.5 Влияние возраста культуры клеток на накопление вируса ЗУД КРС

С целью оценки влияния возраста сформировавшегося монослоя клеток на репродукцию вируса ЗУД культуры клеток ПО и Vero инфицировали вирусосодержащей суспензией 15 пассажа с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в дозе $0,001 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл.}$ в момент посева клеток (в суспензию), 24, 48 и 72 часовой монослой культуры клеток. Культуры готовили из одной расплодки клеток, используя посевную концентрацию 100 – 150 тыс. кл/см³, выращивая в среде Игла – МЕМ, содержащей 10 % сыворотки крови КРС. Инкубировали при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в культуре клеток ПО. Динамика развития ЦПД в обеих культурах клеток была сходная. 24-48-часовой монослой как у культуры клеток ПО, так и у культуры клеток Vero был сформирован молодыми клетками, что благоприятно сказывалось на процесс репродукции вируса. ЦПД проявлялось дегенеративными изменениями в виде нарастающих округленных клеток с последующим лизисом и отслоением. Титр вируса в культуре клеток ПО составлял $5,08 \pm 0,09$ и $5,50 \pm 0,21 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в культуре клеток Vero $4,74 \pm 0,04 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $5,08 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. При использовании культур клеток 72-часового выращивания ЦПД вируса было слабо выражено и накопление его приводило к снижению инфекционной активности вируса и составляла в ПО $4,50 \pm 0,21 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и Vero $4,00 \pm 0,15 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Полученные результаты свидетельствуют о том, что с

увеличением возраста монослоя культуры клеток происходит снижение накопления вируса ЗУД КРС.

3.6 Устойчивость вируса ЗУД КРС при различных температурах хранения

Для изучения устойчивости вируса к воздействию при различных температурных режимах были подготовлены аликвоты вирусосодержащих суспензий с исходной инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, которые хранили при различных температурах (4 ± 2) °С, минус (20 ± 2) °С и минус ($40 \pm 0,5$) °С. Через определенные интервалы времени (1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 месяцев) из каждой партии брали по три пробы и определяли биологическую активность вируса методом титрования в культуре клеток ПО.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сохранность вируса ЗУД зависела от температуры хранения. Так при температуре при 4 °С вирус сохранял свою активность в течение 12 месяцев, при температуре минус 20 °С через 12 месяцев титр вируса снижался на $1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При температуре минус 40 °С инфекционная активность вирусного материала практически не изменялась.

3.7 Выявление антигенов вируса заразного узелкового дерматита методом иммуноцитохимического анализа

В настоящее время в лабораторных исследованиях все большую популярность приобретают иммуногистохимический и иммуноцитохимический методы, поскольку они обеспечивают специфическую визуализацию локализации взаимодействия антиген-антитело в течение нескольких часов или суток после заражения. Предварительно было установлено, что сыворотка крови овец, содержащая антитела к вирусу оспы овец специфически взаимодействует с антигенами вируса ЗУД КРС без фонового неспецифического связывания с клеточными антигенами.

Применение отработанного непрямого ИЦХ метода для раннего выявления антигенов вируса заразного узелкового дерматита в перевиваемой перmissive культуре клеток ПО показало, что в местах взаимодействия антител специфической сыворотки с соответствующими антигенами вируса ЗУД КРС отмечается характерное специфическое красно- или желто-коричневое окрашивание цитоплазмы или клеточной мембраны инфицированных клеток, отсутствующее в препаратах с контрольной нормальной сывороткой и в интактной культуре клеток.

При исследовании окрашенных фиксированных препаратов через 0 – 6 ч культивирования специфического окрашивания клеток не регистрировали. Начиная

с 10 – 12 ч после заражения, в зависимости от метода фиксации клеток отмечали специфическое окрашивание цитоплазмы или клеточной мембраны отдельных инфицированных клеток. Так, при фиксации 80%-ным раствором охлажденного ацетона наблюдали окрашивание цитоплазмы клеток, а при фиксации 0,05%-ным глутаровым альдегидом – клеточных мембран – мест локализации вирусных антигенов, накопления вирусных белков в цитоплазме и на мембране инфицированных клеток. Спустя 24 ч культивирования число специфически окрашенных клеток значительно увеличивалось. К этому времени выявляли и специфические очаги цитопатического действия вируса с окрашенными в них клетками. Через 36 ч после заражения отмечали деструкцию монослоя, а специфический антиген вируса ЗУД КРС выявляли только в отдельных сохранившихся клетках. Препараты культуры клеток при дальнейшем культивировании не исследовали, ввиду проявления 80 – 90 % ЦПД вируса ЗУД КРС.

Результаты, полученные с помощью иммуноцитохимического метода свидетельствуют о том, что выявляемое ЦПД является специфическим для вируса ЗУД, минимальное время раннего выявления антигенов вируса ЗУД КРС в инфицированной перевиваемой линии культуры клеток ПО составляет 10 – 12 ч культивирования, что опережает развитие специфического ЦПД вируса при той же дозе заражения на 36 – 48 ч.

3.8 Изучение восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС при экспериментальном заражении

С целью изучения восприимчивости лабораторных животных к вирусу ЗУД КРС были использованы мыши, хомяки, морские свинки и кролики.

Результаты изучения восприимчивости лабораторных животных показали, что наиболее чувствительными к вирусу ЗУД КРС являлись кролики. На 4 сутки после инокуляции вирусосодержащего материала в местах введения наблюдали образование кожных узелков диаметром 2,0 – 2,5 см. С 7 суток в их крови выявляли геном вируса ЗУД КРС, однако исследования образцов крови на 14, 21 и 28 сутки методом ПЦР-РВ геном вируса обнаруживали у 7 из 8 кроликов. Вируснейтрализующие антитела начинали выявлять с 14 суток в титре 1:4, при дальнейшем исследовании их титр возрастал и составлял 1:8-1:16 на 21 и 28 сутки, соответственно.

Наряду с кроликами наиболее чувствительными к вирусу ЗУД КРС являлись сирийские хомячки, у данных особей так же наблюдали образование кожных

узелков диаметром 0,5 см. При этом узелки отмечали только у хомяков (альбиносов). Геном вируса ЗУД в крови хомяков выявляли у всех животных, начиная с 7 суток. Вируснейтрализующие антитела обнаруживали с 14 суток в титрах 1:8 – 1:32, а на 21 и 28 сутки титр составлял 1:4-1:16 соответственно.

У инокулированных морских свинок и мышей клинических признаков не регистрировали, при этом в их крови и сыворотках выявляли геном вируса и вируснейтрализующие антитела в аналогичных титрах и сроках исследования.

При патологоанатомическом вскрытии всех подопытных животных, изменений во внутренних органах не отмечали, за исключением трех морских свинок, у которых наблюдали поражения в легких. Легкие были кровенаполнены с кровоизлияниями на разрезе.

У контрольной группы животных не регистрировали клинических и патологоанатомических признаков заболевания, а также были получены отрицательные результаты лабораторных исследований (ПЦР-РВ, ИФА).

Дальнейшим этапом после изучения восприимчивости кроликов к вирусу ЗУД КРС и наглядности проявления клинических признаков в местах инокуляции были проведены исследования серийных пассажей на животных с целью изучения возможного получения адаптированного к кроликам штамма вируса ЗУД КРС. С этой целью кроликам 1 пассажа инокулировали внутрикожно (в 2 точки по 250 мкл) и внутривенно (в ушную вену по 500 мкл) культуральный вируссодержащий материал с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, 2 пассаж проводили путем внутрикожного и внутривенного введения вируссодержащего материал (10% суспензия кожных узелков полученных от 1 пассажа), 3 и 4 пассаж выполняли аналогично второму с использованием 10% суспензий от предыдущего пассажа.

При проведении 1 пассажа у всех зараженных животных на 4 сутки после введения в месте инокуляции отмечали образование кожных узелков диаметром 2,0 – 2,5 см (рисунок 2 А). По два кролика из опытной и контрольной групп умертвляли, из пораженных участков кожи готовили 10% суспензию и исследовали на наличие генома, и проводили выделение вируса в перевиваемой линии клеток ПО. Два зараженных кролика с образовавшимися кожными узелками оставляли для наблюдения за развитием патологического процесса (28 суток срок наблюдения).

У опытной группы в полученной суспензии выявляли геном вируса, который был в последующем выделен в культуре клеток ПО. Наличие генома в культуральной суспензии подтверждено ПЦР-РВ. При исследовании образцов, полученных от контрольной группы, геном методом ПЦР-РВ выявлен не был.

При проведении 2 пассажа начиная с 4 суток у кроликов на местах введения отмечали образование кожных узелков в размере 1,5-2,0 см. В апикальной части утолщения наблюдали начальный процесс изъязвления кожного покрова с выделением экссудата (рисунок 2 Б). При проведении 3 пассажа на животных, где, на 4 сутки регистрировали формирование кожных узелков размером до 1 см (рисунок 2 В), полученные образцы при исследовании методом ПЦР-РВ были положительны.

При проведении 4 пассажа, у инфицированных кроликов не наблюдали поражений кожи в месте введения материала (рисунок 2 Г). Через 6 суток после заражения 2 животных из опытной и контрольной группы вывели из опыта и отобрали пробы кожи в местах введения 10 % суспензией 3 пассажа. При постановке ПЦР-РВ все исследуемые образцы дали отрицательный результат.

При патологоанатомическом вскрытии зараженных и интактных кроликов видимые поражения внутренних органов отсутствовали, при исследовании на наличие генома ЗУД в паренхиматозных органах (лёгкие, печень, селезёнка, почки), были получены отрицательные результаты.

На 7-, 14-, 21- и 28-е сутки после инфицирования у животных отбирали пробы сыворотки крови и исследовали их методом ИФА. Антитела к вирусу ЗУД обнаруживали на 28-е сутки (срок наблюдения) после заражения. Изучая образцы кожи кроликов контрольной группы, патологических изменений не выявили. При исследовании на 6 – 7-е сутки проб кожи методом ПЦР-РВ фрагментов генома вируса ЗУД не установили.

В ходе проведённых исследований геном вируса ЗУД КРС выявляли в суспензии кожных узелков у экспериментально зараженных кроликов на уровне 1-3 пассажей. При этом с каждым следующим пассажем геном вируса выявлялся на более поздних циклах, что свидетельствует об уменьшении количества вируса в исследуемых образцах при пассировании. На уровне 4 пассажа узелки в месте введения материала не образовывались и геном вируса ЗУД КРС выявлен не был.



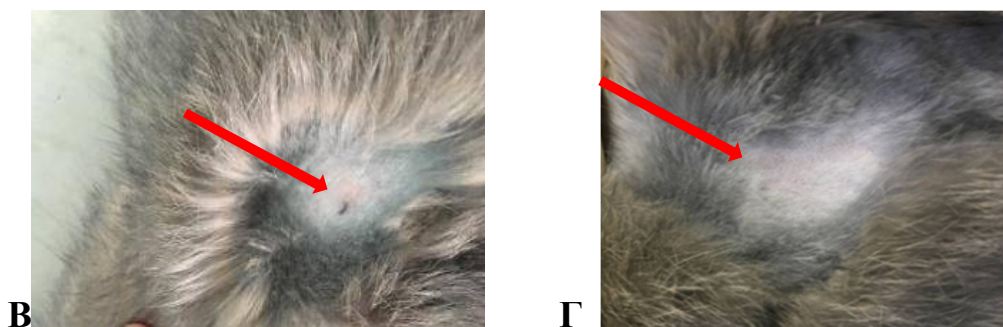


Рисунок 2 - Макроскопические изменения кожи кроликов при проведении 4 пассажных уровней (А, Б, В, Г): А - 1 пассаж, Б - 2 пассаж, В - 3 пассаж, Г - 4 пассаж. Стрелками указаны узелки на коже кроликов, инфицированных вирусом ЗУД.

3.8.1 Гистология и гистохимический анализ для выявления антигена вируса заразного узелкового дерматита

Для изучения гистологических изменений в тканях у кроликов, а также локализации антигена вируса ЗУД в поврежденных клетках кожи животных использовали иммуногистохимический анализ.

При гистологическом исследовании образцов кожи кроликов из контрольной группы не было выявлено патологических изменений, слои кожи были с четкими границами, кровеносные сосуды с умеренным наполнением, гистоархитектоника сохранена.

В коже инфицированных животных в верхних слоях сосочкового слоя наблюдали маляцию эпидермиса. Кровеносные сосуды запустевшие, выявлен отек стенки артерии. В просвете вены регистрировали однородное оксифильное содержимое (плазма крови), ее стенка была истончена. Подкожная клетчатка находилась в состоянии воспаления, что характеризовалось инфильтрацией лимфоидными клетками, в нервном стволе кожи выявлен отек и геморрагии, десквамация интимы в просвете вены.

Данные признаки свидетельствуют о развитии патологического процесса в слоях кожи кролика, аналогичные изменения в тканях кожи также наблюдают у животных, инфицированных оспой овец и коз и у КРС, инфицированных вирусом ЗУД.

Для визуальной оценки мест локализации вирусного антигена в клетках ткани при инфицировании кроликов вирусом ЗУД КРС использовали иммуногистохимический метод исследования. На рисунке 3 представлены гистологические срезы с выполненной ИГХ реакцией: положительно реагирующий участок (А) и контрольный срез (В). При выполнении ИГХ реакции использовали концентрацию первичных антител 1:20, в результате было выявлено положительное

окрашивание метки антивидовых антител в образцах кожи экспериментальных животных, что свидетельствовало о наличии антигена вируса ЗУД КРС в инфицированной ткани кроликов.

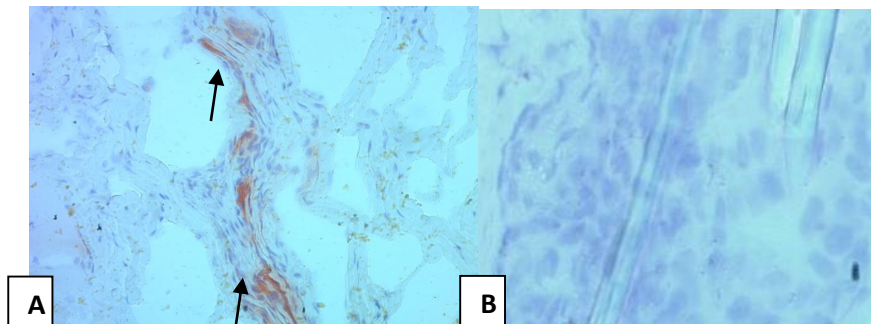


Рисунок 3 – А: положительная, непрямая ИГХ реакция (стрелки), ув. $\times 200$; В: отрицательная ИГХ реакция, контрольный срез кожи, ув. $\times 400$. Докраска ядер гематоксилином Майера

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Выводы

1. Получены культуральные варианты изолята «Волгоградский» вируса ЗУД КРС семейства *Poxviridae*, адаптированные к перевиваемым линиям клеток гомологичного (ПО) и гетерологичного (Vero, РК-13/2-03) происхождения.

2. Определены оптимальные параметры культивирования вируса ЗУД КРС, адаптированного к перевиваемым линиям клеток ПО и Vero: питательная среда Игла MEM с 2 % фетальной сыворотки КРС; множественность заражения культуры клеток 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл, длительность культивирования 5 – 7 суток. При этих условиях культивирования без смены питательной среды вирус накапливался при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ \text{C}$ в титре 5,00 – 6,00 lg ТЦД₅₀/см³.

3. Получен адаптированный к гетерологичной клональной перевиваемой линии клеток почки кролика РК-13/2-03 вирус ЗУД (15 пассаж) путем селективного пассирования в смешанной культуре ПО и РК-13/2-03 с инфекционной активностью — 5,00-5,50 lg ТЦД₅₀/см³, который может быть использован для наработки вирусного сырья в культуре, свободной от патогенов вирусной и прионной природы целевых животных (КРС, мелкий рогатый скот), включая возбудителей медленных инфекций.

4. Установлено, что вирус ЗУД КРС размножается в перевиваемых клетках кожи эмбриона лося (КЭЛ/07) и в клетках легких эмбриона оленя (ЛЭО) относящегося к отряду парнокопытных представителей дикой природы.

5. Доказана эффективность метода иммуноцитохимического анализа (ИЦХ) для раннего выявления антигенов вируса ЗУД КРС в перевиваемой культуре клеток

почки овцы (ПО), который позволяет выявлять антигены вируса ЗУД КРС и их локализацию в клетках инфицированной культуры в течение первых 10-24 часов культивирования после заражения.

6. Установлено, что при воспроизведении инфекционного процесса ЗУД КРС лабораторной моделью могут быть кролики и сирийские хомячки-альбиносы. При внутрикожном заражении хомячков и одновременном внутрикожном и внутривенном заражении кроликов вирусом ЗУД КРС наблюдали клинические признаки (образование кожных узелков): у кроликов на 4 сутки и у сирийских хомячков альбиносов на 10 сутки после инфицирования.

4.2 Практические предложения

На основании проведенных исследований получен штамм «Волгоградский» вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота, который депонирован в коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ под регистрационным номером – «3192».

Разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБНУ ФИЦВиМ «Методические положения по адаптации вируса заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота к перевиваемым линиям клеток».

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

В дальнейшем полученный штамм «Волгоградский» вируса ЗУД КРС может быть использован для разработки методов и средств диагностики ЗУД КРС.

5. СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Пермиссивность культур клеток различного происхождения при культивировании вируса нодулярного дерматита / В.И. Балышева, С.П. Живодёров, **Е.Ю. Пивова**, Н.К. Бобровская, А.В. Живодерова, Л.И. Анисимова, С.Д. Кушнир, Т.Р. Усадов, С.Г. Юрков, Н.И. Сальников, А.В. Луницин // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52, № 6. – С. 1265–1272.

2. Вирус нодулярного дерматита, выделенный в 2015 году в России от крупного рогатого скота, проявляет патогенность для овец при экспериментальном заражении / Т.Р. Усадов, Ю.П. Моргунов, С.П. Живодёров, В.И. Балышева, **Е.Ю. Пивова**, А.Ю. Кольцов, М.М. Сухер, Д.В. Янжиева, А.В. Луницин, Н.И. Сальников // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 2. – С. 438–446.

3. Анализ и прогноз мировой эпизоотической обстановки по нодулярному дерматиту крупного рогатого скота на период до 2030 г. / В.А. Журавлёва, В.М. Балышев, А. В. Книзев, А.Г. Гузалова, М. В. Сидлик, **Е.Ю. Пивова**, А.В. Луницин //

Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2018. – № 139. – С. 83–98.

4. Выявление антигенов вируса заразного узелкового дерматита методом иммуноцитохимического анализа / **Е.Ю. Пивова**, С.П. Живодёров, Л.И. Анисимова, В.И. Балышева // Ветеринария. –2019. –№ 9. – С. 51–54.

5. Пивова, Е.Ю. Восприимчивость кроликов к вирусу заразного узелкового дерматита крупного рогатого скота при экспериментальном заражении / **Е.Ю. Пивова**, С. П. Живодёров, М.Е. Власов // Ветеринария. –2021. –№6. – С. 20–24.

6. Investigation of pathogenicity of lumpy skin disease virus for sheep / Т. Usadov, Y.Morgunov, S. Zhivoderov, **Е. Pivova**, V. Balysheva, A. Lunitsyn, N. Salnikov // EPIZONE, 11th Annual Meeting. – Paris, 2017. – P. 131.

Подписано в печать 11.04.2022 г.

Формат 60x90 1/16. Усл. печ. л. 1

Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»