

7. Ивашкин В.М., Орипов А.О., Сонин М.Д. Определитель гельминтов мелкого рогатого скота. – М.:Наука, 1989. – 255 с.
8. Османов С.О. Паразиты рыб Узбекистана. – Ташкент: Фан, 1971. – 532 с.
9. Рыжиков К.М., Шарпило В.П., Шевченко Н.Н. Гельминты амфибий фауны СССР. – Москва: Наука, 1980. – 280 с.
10. Скрыбин К.И. Методы полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая и человека. – Москва: 1-го МГУ, 1928. – 45 с.
11. Спасский А.А. О таксономическом статусе трематод // Систематика, таксономия и фауна паразитов. – М., 1996. – С.113-114.
12. Султанов М.А. Гельминты домашних и охотничье-промысловых птиц Узбекистана. – Ташкент: Изд.АН УзССР, 1963. – 467 с.
13. Токобаев М.М.Чибиченко Н.Т. Трематоды фауны Киргизии. – Фрунзе: Илим, 1978. – 233 с.
14. Уразбаев А. Паразиты рыб в прудах Каракалпакии.: Автореф. дис. ... канд. биол.наук. – Ташкент, 1973. – 32 с.
15. Шакарбоев Э.Б. Трематоды позвоночных Узбекистана (видовой состав, пути циркуляции и эколого-биологические особенности).: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Тошкент, 2009. – 38 с.
16. Шарпило В.П. Паразитические черви пресмыкающихся фауны СССР (систематика, хорология, биология). – Киев: Наукова Думка, 1976. – 287 с.
17. Gibson D.I. Keys to the Trematoda.Vol.1. – London, UK, 2002. – 540 p.

УДК:576.858.8

OBTAINING A CLONA OF «NEETHLING-RIBSP/C7 ATTENUATED LUMPY SCIN DISEASE VIRUS

N. Aubakir¹, Y. Karmyshova², M.Orynbaev¹

¹*Research Institute for Biological Safety Problems, Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan*

²*Kyrgyz State University named after I. Arabaev, Kyrgyzstan,*

ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНА NEETHLING-RIBSP/C7 АТТЕНУИРОВАННОГО ВИРУСА НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА

Н.А. Дубәкір¹, Ү.Ж. Кармышова², М.Б. Орынбаев¹

¹*РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности МЗ РК,*

²*Кыргызский государственный университет им.И.Арабаева, Кыргызстан,*

АТТЕНУИРЛЕНГЕН НОДУЛЯРДЫК ДЕРМАТИТ ВИРУСУНУН «NEETHLING-RIBSP/C7» КЛОНУН АЛУУ

Н.А. Дубәкір¹, Ү.Ж. Кармышова², М.Б. Орынбаев¹

¹*РГП биологиялык коопсуздук проблемаларын илимий-изилдөө институту, Казакстан*

²*И.Арабаев ат. Кыргыз мамлекеттик институту*

nurdos.aubakirov@mail.ru, umut_kj@mail.ru

Abstract. The aim of this study was to obtain a harmless clone of the attenuated strain «Neethling-RIBSP» lumpy skin disease virus. To achieve this goal, the attenuated strain «Neethling-RIBSP» was cloned by the method of limiting dilutions. In the subsequent selection of clones used the reaction of plaque formation. As a result of cloning, 9 clones of the «Neethling-RIBSP» strain of Lumpy Dermatitis Virus were obtained. Growth characteristics of clones of the «Neethling-RIBSP» strain of lumpy skin disease virus were determined by infecting the cells of the culture of the testicular lambs (TU).

Studies have shown that out of 9 clones obtained, only 4 had pronounced cultural properties and accumulated in TU cell culture in titers of 5.5-6.0 lg TCID₅₀/cm³. The remaining 5 clones replicated poorly in TU cell culture. To determine the least areactogenic clone of the attenuated Neethling-RIBSP strain, animals were vaccinated with each clone intradermally in dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁶ and 5 animals subcutaneously in a field dose. Studies have shown that both with subcutaneous and intradermal administration of the Neethling-RIBSP/C7 clone, the experimental animals remained clinically healthy, the body temperature of the experimental animals was within the physiological norm, and no local reactions were noted at the injection site.

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

Аннотация. Целью настоящих исследований являлось получение безвредного клона аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита. Для достижения поставленной цели было проведено клонирование аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» методом предельных разведений. При последующем отборе клонов использовали реакцию бляшкообразования. В результате клонирования получили 9 клонов штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита. Ростовые характеристики клонов штамма «Neethling-RIBSP» вируса нодулярного дерматита определяли путем инфицирования клеток культуры теститкулы ягнят (ТЯ). Исследования показали, что из полученных 9 клонов только 4 обладали выраженными культуральными свойствами и накапливались в культуре клеток ТЯ в титрах 5,5-6,0 lg TCID₅₀/cm³. Остальные 5 клонов плохо реплицировались в культуре клеток ТЯ. Для определения наименее ареактогенного клона аттенуированного штамма «Neethling-RIBSP» каждым клоном вакцинировали животных внутрикожно в разведениях с 10⁻¹ по 10⁻⁶ и по 5 животных подкожно в полевой дозе. Проведенными исследованиями было показано, что как при подкожном, так при внутрикожном введении клона Neethling-RIBSP/C7 опытные животные оставались клинически здоровыми, температура тела опытных животных была в пределах физиологической нормы, на месте введения вакцины местных реакций отмечено не было.

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

Аннотация. Бул изилдөөнүн максаты тери оорусунун Neethling-RIBSP аттенуацияланган штаммынын зыянсыз клонун алуу болгон. Бул максатка жетүү үчүн Neethling-RIBSP аттенуацияланган штамм чектүү суюлтуу ыкмасы менен клондолгон. Клондорду кийинки тандоодо кесек (бляшка) пайда болуу реакциясы колдонулат. Клондоштуруунун натыйжасында Neethling-RIBSP штаммынын 9 клону, нодулярдык дерматит вирусу алынды. Нодулярдык тери оорусунун вирусунун Neethling-RIBSP штаммынын клондорунун өсүү мүнөздөмөлөрү козулардын уругунун (КУ) культура клеткаларын инфицириялоо жолу менен аныкталган. Изилдөөлөр көрсөткөндөй, алынган 9 клондун ичинен төртөө гана ачык культуралык касиеттерге ээ жана 5,5-6,0 lg TCID₅₀/cm³ титрде TU клетка культурасында топтолгон. Калган 5 клон TU клетка культурасында начар репликацияланган. Аттенуацияланган Neethling-RIBSP штаммынын эң аз арактогендик клонун аныктоо үчүн жаныбарлар ар бир клон менен тери ичине 10⁻¹ ден 10⁻⁶ га чейинки суюлтууларда жана 5 жаныбарга талаа дозада тери астына вакцинацияланган. Изилдөөлөр көрсөткөндөй, Neethling-RIBSP/C7 клонун тери астына жана териге киргизүүдө эксперименттик жаныбарлар клиникалык жактан дени сак бойдон калган, эксперименттик жаныбарлардын дене температурасы физиологиялык нормада болгон жана инъекция болгон жерде жергиликтүү реакциялар байкалган эмес.

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

Nodular dermatitis is a disease of cattle characterized by fever, damage to the eye, lymph system, mucous membranes of the respiratory tract and gastrointestinal tract, swelling of subcutaneous tissue, as well as internal organs, the formation of dermatological nodes [1,5]. In recent years, nodular dermatitis of cattle has become widespread and causes enormous damage to animal husbandry in many countries of the world. The disease is registered in many countries of the world, including Kazakhstan. The only way to successfully control diseases is rapid and effective diagnosis and vaccination.

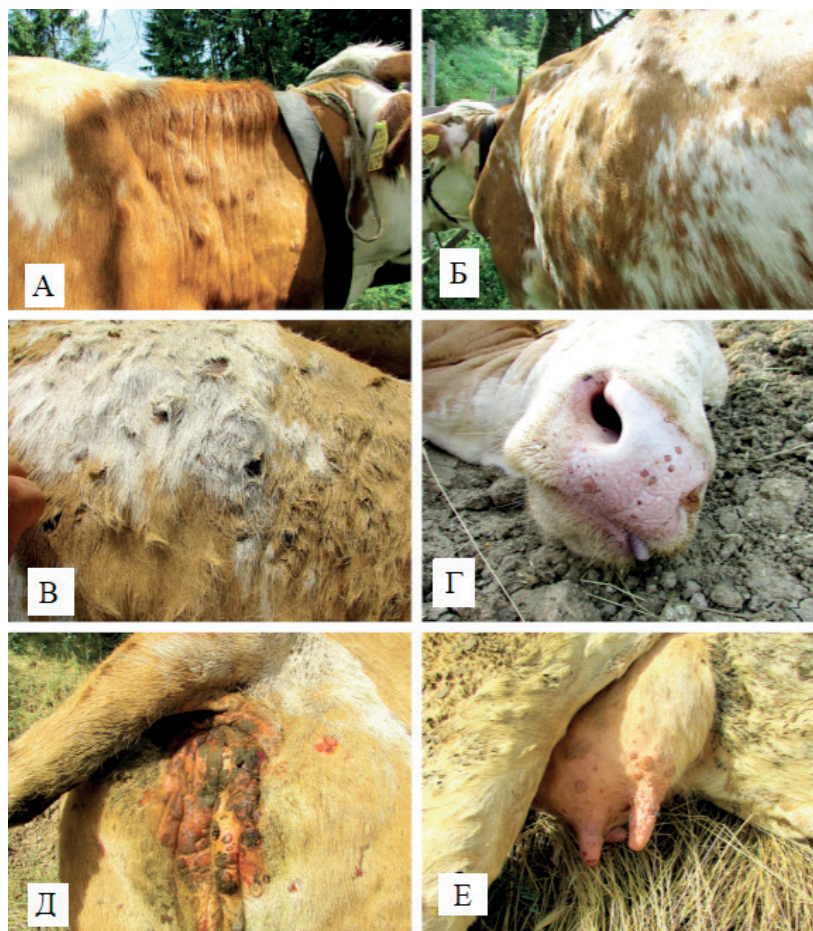


Figure 1. Macroscopic view of skin lesions in cattle caused by ND; A - nodules on the neck; B - nodules on the body; B - ulcer-like nodules on the trunk; D - necrotic plaques on the muzzle; D - limited necrotic plaques on the vulva; E - limited necrotic plaques on the udder.

In the coming decades, the proportion of vaccine prophylaxis in the framework of the implementation of the policy – achieving health for all will continuously increase.

The world's existing vaccines for the prevention of lumpy skin disease are mainly presented from live homologous and heterologous strains. Due to the close genetic relationship, there is evidence of the use of heterologous vaccine strains for the prevention of lumpy skin disease in cattle [3,4]. Nevertheless, data on recent outbreaks show that the use of heterologous vaccine strains in the fight against lumpy skin disease is not a fully justified measure.

Therefore, despite the existing vaccines in the world and efforts to eliminate lumpy skin disease, the question of finding new, more effective vaccines that can be differentiated from the wild virus, can be quickly developed and easily produced in the region remains open [8].

Undoubtedly, live attenuated vaccines are the most successful, due to the replication of the vaccine strain in the macroorganism, which provides a greater probability of launching cellular and humoral links. But, unfortunately, contact with a weakened immune system, occasionally, can lead to reactivation of the virulent properties of the vaccine strain, so the importance of studying the reversible properties for several passages is high [6,7]. The study showed that the attenuated virus is not transmitted from an immunized animal and is not released into the environment.

In 2018, RIBSP employees obtained an attenuated strain of Neethling on transplanted and primary trypsinized cell cultures, as well as developing chicken embryos, by means of multiple consecutive and intermittent passages of the epizootic virus «Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ» isolated from pathological material from animals that died in 2016 from nodular dermatitis in Atyrau region. RIBSP [2]. Studies have shown that this strain, like all currently existing vaccine strains, causes post-vaccination complications in up to 10% of vaccinated animals. Complications are manifested by the formation of seals of various sizes at the site of administration of the vaccine, a short-term increase

in body temperature. The aim of these studies was to obtain a harmless clone of the attenuated strain «Neethling-RIBSP» of nodular dermatitis virus.

To achieve this goal, the attenuated strain «Neethling-RIBSP» was cloned by the method of marginal dilutions. During the subsequent selection of clones, a plaque formation reaction was used, after which the cultural properties, harmlessness in animals were studied and the genome of the virus was sequenced.

As a result of cloning, we obtained 9 clones of the «Neethling-RIBSP» strain of nodular dermatitis virus. The growth characteristics of clones of the «Neethling-RIBSP» strain of nodular dermatitis virus were determined by infecting cells of lambs testicle culture. Studies have shown that out of the 9 clones obtained, only 4 had pronounced cultural properties and accumulated in the culture of lamb testicle cells in the titers of 5.5-6.0 lg TCD₅₀/cm³. The remaining 5 clones were poorly replicated in the culture of CHA cells. The clones Neethling-RIBSP/C1, Neethling-RIBSP/C4, Neethling-RIBSP/C5, Neethling-RIBSP/C7 were selected for further animal harmlessness studies.

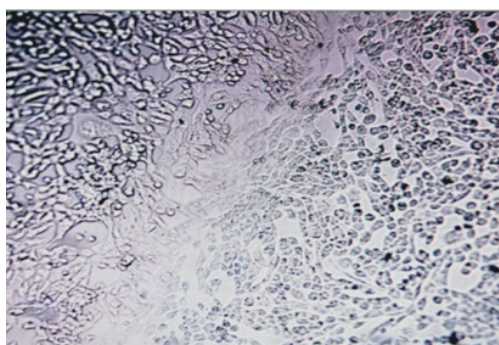


Figure 2. Almost completely destroyed TC monolayer, character ny for 6-7 days of action of the virus «Neethling-RIBSP / C7».

To determine the least areactogenic clone of the attenuated strain «Neethling-RIBSP», each clone was vaccinated with animals intradermally in dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁶ and 3 animals subcutaneously in a field dose. Vaccinated animals were monitored on a daily clinical basis. The conducted studies showed that both subcutaneous and intradermal administration of the Neethling-RIBSP/C7 clone, experimental animals remained clinically healthy, the body temperature of experimental animals was within the physiological norm, no local reactions were noted at the site of vaccine administration. The remaining three clones with their subcutaneous and intradermal administration caused the formation of swellings at the injection site up to 20 cm in size in experimental animals, as well as a short-term increase in body temperature.

Genome-wide sequencing of the resulting areactogenic clone Neethling-RIBSP/C7 showed that it has an additional 3 deletions in the LD007 gene encoding the ankyrin repeat protein, with the loss of fragments of 3, 2 and 4 nucleotides.

Thus, as a result of the conducted studies, an areactogenic completely harmless clone of Neethling-RIBSP/C7 was obtained from the attenuated strain «Neethling-RIBSP» by the method of marginal dilutions, suitable for the specific prevention of nodular dermatitis of cattle.

REFERENCES

1. Kitching R. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. Dev Biol (Basel) 2003. – 114 – P.16-17.
2. Orynbayev MB, Nissanova RK, Argimbayeva TU, Zakarya KD, Myrzakhmetova BS, Melisbek AM, Barmak SM, Issabek AU, Nakhanov AK, Shevtsov A, Kozhabergenov NS, Sultankulova KT. 2020. Genomic sequence of the new attenuated vaccine strain Neethling-RIBSP of the lumpy skin disease virus. Microbiol Resour Announc 9:e00318-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00318-20>.

3. Milovanović, M., Dietze, K., Milićević, V. et al. Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests. BMC Vet Res 15, 80 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1831-y>

4. A. Gelagay, A. Yebeyen, T. Tesfaye, N. Haileleul, G. Esayas. Lumpy Skin Disease: Preliminary vaccine efficacy assessment and overview on outbreak impact in dairy cattle at Debrezeit, central Ethiopia. Antiviral research. 2013. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.02.008.

5. Al-Salihi, Karima. Lumpy Skin disease: Review of literature. 2014. Mirror res.vet.e-ISSN 2307-8073. – 3. – P.6-23.

6. Tuppurainen, E., Alexandrov, T. & Beltrán-Alcrudo, D. 2017. Lumpy skin disease field manual – A manual for veterinarians. FAO Animal Production and Health Manual No. 20. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). – 60 p.

7. Lee, N.-H., Lee, J.-A., Park, S.-Y., Song, C.-S., Choi, I.-S. & Lee, J.-B. (2012). Обзор разработки и исследования вакцин для промышленных животных в Корее. Клинические и экспериментальные исследования вакцин, 1 (1), 18. <https://doi.org/10.7774/cevr.2012.1.1.18>

8. Babiuk, Shawn. (2018). Treatment of Lumpy Skin Disease. 10.1007/978-3-319-92411-3_17.

9. Mathijs E., Vandenbussche F., Haegeman A., Nthangeni B., Van Borm S. and De Clercq K. Complete Genome Sequences of the Neethling-like Lumpy Skin Disease Virus Strains from Three Commercial Live Attenuated Vaccines. // Genome Announc. – 2016. – Vol. 4(6): e01255-16. doi:10.1128/genomeA.01255-16

Әубәкір Нұрдос Аманжанұлы, РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, МЗ РК, пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, 080409, Казахстан, магистр биологии КГУ им.И.Арабаева.

Кармышова Умутбүбү Жолдошевна, Кыргызский Государственный университет им. И.Арабаева, г. Бишкек, Кыргызстан, кандидат биологических наук, и.о.доцент.

Орынбаев Мухит Бармакович, РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, МЗ РК, пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область, 080409, Республика Казахстан, кандидат ветеринарных наук, профессор, член-корр.НАН РК.

Әубәкір Нұрдос Аманжанұлы, РГП биологиялық коопсуздық проблемаларын илимий-изилдөө институту, Гвардейский шаарчасы, Кордай району, Казакстан жана И.Арабаев атындагы Кыргыз мамлекеттик университети, магистранты.

Кармышова Умутбүбү Жолдошевна,

И.Арабаев атындагы Кыргыз мамлекеттик университети, биол. илим. канд., доц. м. а. Бишкек шаары, Кыргызстан.

Орынбаев Мухит Бармакович,

РГП биологиялық коопсуздық проблемаларын илимий-изилдөө институту, Гвардейский шаарчасы, Кордай району, Казакстан, вет.илим. канд., проф., Казахстан Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын мүчө-корреспонденти, Казакстан, Гвардейский шаарчасы.

Nurdos Aubakir, Republican State Enterprise Scientific Research Institute of Biological Safety Problems, Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, town. Gvardeisky, Kordai district, Zhambyl region, 080409, Kazakhstan, Master of Biology, KSU named after I. Arabaev. nurdos.aubakirov@mail.ru

Umutbubu Karmyshova, Kyrgyz State University named after I. Arabaeva, Bishkek, Kyrgyzstan, Candidate of Biological Sciences, Acting Associate Professor. umut_kj@mail.ru

Mukhit Orynbaev, Republican State Enterprise Scientific Research Institute of Biological Safety Problems, Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, town. Guards, Kordai district, Zhambyl region, 080409, Republic of Kazakhstan, candidate of veterinary sciences, professor, corresponding member of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.