

Майхин К. Т., кандидат ветеринарных наук, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0003-1744-2860>
Алматинский филиал «Национальный референтный центр по ветеринарии», г. Алматы, проспект Райымбека, 221в, А20С2D0Ю, Казахстан, maikhin67@mail.ru

Бердикулов М. А., кандидат ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0003-1304-0354>
«Национальный референтный центр по ветеринарии», г. Нур-Султан, ул. 150 лет Абая, 22/3. Z00P5F2, Казахстан, berdikulov.ma@mail.ru

Мусаева Г. К., магистр ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0003-1361-0628>
Алматинский филиал «Национальный референтный центр по ветеринарии» г. Алматы, проспект Райымбека, 221в, А20С2D0Ю, Казахстан, musaeva1984@mail.ru

Жусамбаева С. И., кандидат ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0002-3356-2160>,
Алматинский филиал «Национальный референтный центр по ветеринарии»,
г. Алматы, проспект Райымбека, 221в. А20С2D0Ю, Казахстан, syly65@mail.ru

Алиханов К. Д., PhD, <https://orcid.org/0000-0001-9514-7678>
НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, проспект Абая 26, А15С8А3, Казахстан, mr.kuantar_87@mail.ru

Maikhin K. T., Candidate of Veterinary Sciences, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0003-1744-2860>

Almaty branch Sciences «National Reference Center for Veterinary», Almaty, 221в Rayymbek Avenue, А20С2D0Ю, Kazakhstan, maikhin67@mail.ru

Berdikulov M. A., Candidate of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0003-1304-0354>
«National Reference Center for Veterinary», Astana, ul. 150 years of Abai, 22/3, А20С2D0Ю, Kazakhstan, berdikulov.ma@mail.ru

Mussayeva G. K., Master of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0003-1361-0628>
Almaty branch «National Reference Center for Veterinary», Almaty, 221в Rayymbek Avenue, А20С2D0Ю, Kazakhstan, musaeva1984@mail.ru

Zhussambayeva S. I., Candidate of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-3356-2160>
Almaty branch «National Reference Center for Veterinary», Almaty, 221в Rayymbek Avenue, А20С2D0Ю, Kazakhstan, syly_65@mail.ru

Alikhanov K. D., PhD, <https://orcid.org/0000-0001-9514-7678>
NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, Abai Avenue 26, А15С8А3, Kazakhstan, mr.kuantar_87@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА ВИРУСА ОСПЫ ВЕРБЛЮДОВ ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CAMEL POXVIRUSSTRAIN

Аннотация

Оспа верблюдов - контагиозная болезнь, протекающая с образованием характерной узелково-пустулезной оспенной сыпи на коже и слизистых оболочках. Возбудители - крупные эпителиотропные вирусы из группы покс-вирусов. Инкубационный период, в зависимости от возраста верблюдов, свойств вируса и путей его проникновения в организм, колеблется от 3 до 15 дней: у молодых животных 4-7, у взрослых 6-15 дней. Вирус оспы верблюдов, «М-0001» был выделен из оспенных пораженных участков кожного покрова от больного верблюда в «Национальный референтный центр по ветеринарии». В результате проведенных экспериментальных работ изучены основные вирусологические и молекулярно-генетические характеристики штамма оспы верблюдов «М0001», кандидата для изготовления вакцины против оспы верблюдов. Результаты ПЦР свидетельствуют, что исследуемый образец по размеру накопленных амплификатов, составляющих 241 п.о., является видоспецифическим и соответствует вирусу оспе верблюдов. Учитывая максимальный процент совпадения анализируемой последовательности в международной базе данных по алгоритму BLAST, а также результатов филогенетического анализа установлено, что образец М0001 относится к *Camelpox virus*, (инвентарный номер GeneBank [KP768318.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP768318.1)). Результаты проведенных опытов показывают,

что к изоляту выделенного CMLV из числа испытанных первично-трипсинизированных культур клеток наиболее чувствительным оказались линия клеток ПЯ и ТЯ, в перевиваемых клеточных линиях ЦПД вируса было менее заметным и слабым, а на третьем пассаже ЦПД уже не проявлялось.

ANNOTATION

Camelpox is a contagious disease that occurs with the formation of a characteristic nodular-pustular smallpox rash on the skin and mucous membranes. The incubation period, depending on the age of the camels, the properties of the virus and the ways of its penetration into the body, ranges from 3 to 15 days: in young animals 4-7, in adults 6-15 days. Camel pox virus, «M-0001» was isolated from smallpox affected areas of the skin from a sick camel to the «National Reference Center for Veterinary Medicine». As a result of the experimental work carried out, the main virological and molecular genetic characteristics of the camel pox strain «M0001», a candidate for the manufacture of a vaccine against camel pox, were studied.

The results of PCR indicate that the sample under study is species-specific in terms of the size of accumulated amplifications amounting to 241 pp. and corresponds to the camel pox virus. Taking into account the maximum percentage of coincidence of the analyzed sequence in the international database using the BLAST algorithm, as well as the results of phylogenetic analysis, it was found that the M0001 sample belongs to CMLV virus, (Gene Bank inventory number KP768318.1).

The results of the experiments show that to isolate the isolated CMLV from the number of tested primary trypsin zed cell cultures, the most sensitive was the cell line of the LK and LT, in the transplanted cell lines, the CPE of the virus was less noticeable and weak, and on the third passage, the CPE was no longer manifested.

Ключевые слова: верблюды, оспа, изолят, титр вируса, культивирования, доза вируса, чувствительность, титр вируса.

Key words: camels, smallpox, isolate, virus titer/, cultivation, virus dose, sensitivity, virus titer.

Введение. CMLV (оспа верблюдов) — широко распространенное инфекционное вирусное заболевание верблюдов. По таксономии CMLV относится к виду Camelpox, роду Orthoroxvirus, входящий в обширное семейство Poxviridae, которое объединяет вирусы человека, животных, птиц и насекомых. Вирус оспы представляет собой довольно большие вирионы со средними размерами 220×280 нм. Поскольку болезнь распространяется только среди верблюдов, в отличие от вируса оспы коров изучен возбудитель недостаточно. Тем не менее существуют данные об относительно невысокой устойчивости вируса вне организма. Так при кипячении он погибает мгновенно, при температуре 60°C в течение 15 минут. В загнивающем патологическом материале быстро инактивируется, а солнечные лучи либо действие искусственного ультрафиолетового облучения уничтожают возбудителя болезни в течение 2–3 часов [1, 2].

CMLV очень заразен по своей природе и вызывает серьезные последствия для здоровья, вплоть до смертности верблюдов, и причиняет экономический ущерб владельцам верблюдов. Проявляется либо в локальной легкой, либо в генерализованной тяжелой форме.

Впервые болезнь была описана в середине прошлого столетия на в одном из районов Индии, а в конце прошлого века данное заболевание верблюдов была изучена, выделен специфический возбудитель. Однако полной ясности с этой болезнью пока нет. Отмечено, что CMLV непатогенен для большинства животных, вместе с тем возможно экспериментальное заражение кроликов и лабораторных мышей. Исходя из этого для точного установления возбудителя болезни проводят биологическую пробу именно на верблюжатах [3-5].

По неофициальным данным, последний крупный падеж верблюдов в Туркменистане произошел около 25 лет назад [5, 6]. Не смотря на улучшение эпизоотической ситуации по CMLV в Республике Казахстан проблема оздоровления поголовья верблюдов окончательно не решена. Причиной которого является реструктуризация животноводства, создание фермерских и арендных хозяйств, увеличение поголовья животных в личных хозяйствах граждан, а также повысилась опасность заноса возбудителей оспы верблюдов в благополучные стада.

Диагноз на оспы верблюдов можно поставить на основании клинических признаков у пораженных животных оспы. После появления клинических признаков заболевания образцы

тканей (биопсия кожи или органов) наиболее полезны для идентификации возбудителя инфекции. Для постановки диагноза необходимо использовать несколько диагностического метода, поскольку существует много диагностических подходов, а именно: трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), выделение вируса с помощью культуры клеток, стандартные ПЦР-анализы, иммуногистохимия и демонстрация нейтрализующих антител. Однако идентичность возбудителя как CMLV должна быть подтверждена с помощью ТЭМ, ПЦР и/или секвенирования. ТЭМ и ограничительный ферментный анализ (РЭА) могут быть использованы для дифференциации верблюжьей оспы от других инфекций, вызванных OPV (*Orthopoxvirus*) и PPV (*вирус оспы (шарки) сливы*). ТЭМ позволяет дифференцировать OPV, которые имеют кирпичную форму, и PPV, которые имеют яйцевидную форму. Антиген верблюжьей оспы в инфицированных струпьях и оспинах может быть идентифицирован с помощью метода иммуногистохимии. Выделение вируса с использованием эмбриональных яиц и различных клеточных линий, а также первичных клеточных культур могут быть использованы для исследования изоляции. Однако само по себе выделение не может быть золотым стандартом диагностики, за ним должны следовать серология или ПЦР [7, 8, 9].

Лечения при данной болезни не предусмотрено, хотя на лабораторных моделях показана эффективность в подавлении вируса некоторых противовирусных препаратов. В качестве профилактики при оспе верблюдов используют вакцинацию. В мире разработаны как живые, так и инактивированные вакцины [10, 11].

Эффективный способ борьбы с CMLV - вакцинация. В разных странах имеется несколько вакцин от оспы верблюдов, как инактивированных, так и живых ослабленных. Живая аттенуированная вакцина Discarox производится в Южной Африке, инактивированная вакцина T8 была разработана в Марокко в 1992 году и живая аттенуированная вакцина Jouf-78 производства Саудовской Аравии [12].

Они содержат следующие штаммы: CML / Db-92, CML / Nw-wt, CML / Tm-wt, ХМЛ / Ш30-ВТ, CML / Sh41-wt, CMLV / 43- Weight указанные штаммы, выделены в разные годы от больных верблюдов в Судане в различных культурах клеток; CMLV- Jouf (Штамм AlJouf CMLV, выделенный из больных верблюдов в Саудовской Аравии и пассированный в культуре клеток почки верблюда); Discarox (Дубайская аттенуированная вакцина против верблюжьей оспы, полученная путем пассирования в клетках Vero в Центральной ветеринарной исследовательской лаборатории (CVRL), Дубай, с использованием изолята ОАЭ (штамм CaPV298-2); Jouf-78, VD47 / 25, Discarox 298/89; CMLV- 1 (ДНК, выделенная из очищенного CMLV-Тегеран или CP-1); 6) CMLV-14 (ДНК, выделенная из очищенного CMLV CP-14, выделенного из верблюдов в Объединенных Арабских Эмиратах) [12, 13, 14].

Вакцина против оспы верблюдов так же разработана в РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» [15].

Аттенуированные вакцины более эффективны, вызванный ими иммунитет более продолжителен в сравнении с инактивированными вакцинами. В то же время, широкое их применение на свободных от вируса территориях сопряжено с большими рисками распространения мезогенных штаммов вируса в здоровой популяции, что может сопровождаться снижением продуктивности верблюдов (понижением удоев и скорости набора веса животными). Таким образом, отсутствие рентабельной вакцины против верблюжьей оспы в Республике Казахстан и во многих странах, занимающихся разведением верблюдов, является основным препятствием в борьбе со вспышками болезни. Планируемая нами исследования предусматривает характеристику нового выделенного штамма CMLV используемый для изготовления вакцины.

Результаты этой работы дадут возможность оптимизировать противозооотические мероприятия по недопущению возникновения и распространения этой болезни среди верблюдов в Республике Казахстан.

Материалы и методы исследований. *Культивирование CMLV.* Для изучения культуральных свойств вируса были проведены исследования на первичных линиях культур клеток: ПЯ (почка ягнят), ТЯ (тестикул ягнят), ПО (почка овца), МДБК (почка коровы), Vero (почка зеленой мартышки), ТТ (трахея теленка), а также для изучения репродуктивных свойств вирусного изолята оспы верблюдов.

Для культивирования и адаптации использовали 20%-ную суспензию, приготовленную из биологического материала, выделенного из Мангистауской области от заболевших CMLV. Изучение чувствительности первичных и перевиваемых линий клеток к изоляту проверяли в 3-х

последовательных пассажей. Из отобранных культур клеток сливали питательную среду, часть культур (не менее 2) оставляли в качестве контроля, в них вносили по 1 мл поддерживающей среды. В другие 4 матраса с клеточным монослоем вносили по 1 мл вирусосодержащего материала. Все культуры в матрасах (контрольные и опытные) помещали в термостат, выдерживали 1 час при 37⁰С и инокулят сливали, монослой промывали раствором Хенкса 2-3 раза, заменяли инокулят на свежую поддерживающую среду и культивировали при той же температуре в течение 10-12 суток. Во время инкубации среду в матрасах заменяли через каждые 3-ое суток.

В течение указанного срока ежедневно проводили микроскопию монослоя с целью выявления ЦПД (цитопатическое действие) вируса.

Определение чувствительности культур клеток к изоляту CMLV на каждом пассаже оценивали по сроку наступления ЦПД, интенсивности его развития и титру вируса в момент окончания культивирования. Для проведения очередного последовательного пассажа в сроки максимального развития ЦПД (80% и более площади монослоя клеток) или в случае не проявления и слабого его развития, на 10-12 сутки после заражения, замораживали при минус 40⁰С, размораживали при комнатной температуре, объединяли в отдельных матрасах и полученную суспензию после проверки на стерильность (МПБ, МПА), использовали для заражения свежей аналогичной культуры клеток.

Методика заражения, культивирования, сбора вируса, оценки чувствительности и адаптации культур клеток на втором и последующих пассажах аналогична методике на первом пассаже [16, 17].

Определение титра биологической активности CMLV. Культуры клеток: (Vero, ПО, ТТ, МДВК, ТЯ, ПЯ,) высевали на 96-луночных планшетах за 24 ч до заражения. Супернатанты вируса оспы верблюдов разводили 10-кратно методом серийных разведений (от 10¹ до 10⁷) и 200 мкл каждого разведения высевали в шести лунках. В качестве контроля использовали клеточную культуральную среду без вируса. Инфицированные плашки с культурой клеток инкубировали при 37⁰С в течение 5-7 суток в зависимости от срока проявления ЦПД, титр вируса вычисляли в Ig ТЦД_{50/см³} Титр вируса рассчитываем по методу Рида и Менча Питательную среду в плашках меняли через каждые 2-3 суток в зависимости от рН среды [18, 19].

В изучении молекулярно-генетических характеристик были использованы информации и программные утилиты «BLAST» и «Vector NTI 9.1.0». Для ПЦР-амплификации применялась плазмидная ДНК с маркерной вставкой.

Вирусные ДНК выделены с использованием набора PureLink Microbiome DNA kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя [20].

Фрагментация ДНК будет проведена до размеров около 400–450 п.о. с применением набора DNA Fragmentation kit (NEB, США). Подготовка библиотек для массового параллельного секвенирования будет осуществлена с помощью набора NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, США), согласно прилагаемому протоколу. Качество приготовленных библиотек будет проверено на приборе «Bioanalyzer 2100» (Agilent Technologies, Германия) [21].

Секвенирование будет проводиться с использованием комплекта MiSeq Reagent v.3 (Illumina, США) на секвенаторе нового поколения «MiSeq» (Illumina, США).

Биоинформационный анализ полученных в результате секвенирования последовательностей будет проведен с использованием компьютерной программы Geneious 11.0 (Biomatters, Новая Зеландия) [22].

Выравнивание и филогенетический анализ секвенированных генов с нуклеотидными последовательностями из GenBank будет проводиться с помощью компьютерной программы MEGA 6.0 методом максимального правдоподобия на основании 500 выборок, модель GTR.

Результаты и их обсуждение. При вспышке оспы верблюдов в Мангистауской области сотрудниками национального референтного центра по ветеринарии в 2020 году были отобраны парные пробы крови для проведения ИФА и ПЦР, а также были взяты пробы из оспенных пораженных участков кожного покрова от большого верблюда для проведения ПЦР.

Результаты исследований представлены в таблице и на рисунке 1.

Область	Районы	Количество отобранных проб	Результаты ИФА	Результаты ПЦР
---------	--------	----------------------------	----------------	----------------

Мангистауская	г. Актау	15	–	–
	г. Жанаозен	20	–	–
	Бейнеуский	50	9	9
	Тупкараганский	50	13	13
	Мангистауский	50	5	5
	Каракинский	15	–	–
Всего:		200	27	27

Таблица 1 – Результаты исследования ПЦР и ИФА

Как видно из таблицы 1, все исследованные 27 проб из Мангистауской области (Бейнеуский, Тупкараганский, Мангистауский районы) дали положительный результат при исследовании методами ИФА и ПЦР.

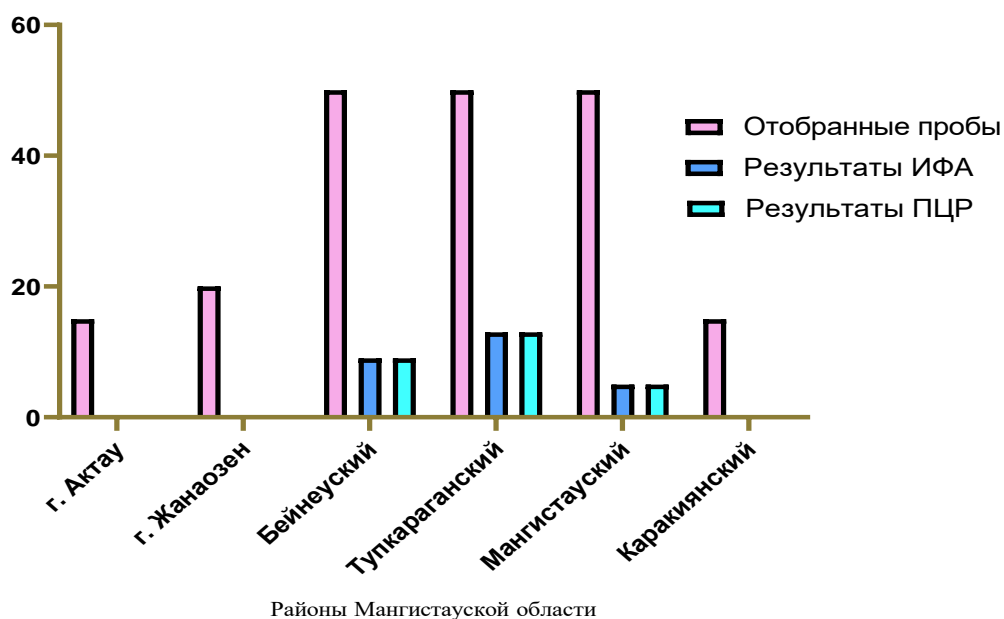


Рисунок 1 – Визуализация результатов исследования ПЦР и ИФА

Из отобранного биологического материала была изготовлена 20%-ная тканевая суспензия на стерильном физиологическом растворе, которая подверглась трехкратному замораживанию и оттаиванию, центрифугированию при 3500 об/мин в течение 30 минут. Надосадочная жидкость была перенесена в стерильные пробирки, после добавления антибиотиков была выдержана при комнатной температуре 30 минут. Далее надосадочная жидкость была исследована на стерильность.

Далее выделенный изолят был исследован на вирусологические исследования для изучения культуральных свойств. Для заражения культур клеток вирусом из сосудов с культурой клеток удаляли ростовую среду, вносили вирусную суспензию в соответствующей дозировке и оросив поверхность монослоя легким покачиванием выдерживали при 37°C в течение 1 часа, затем инокулят сливали, монослой зараженной культуры клеток заливали поддерживающей средой и продолжали культивирование при 37°C.

Сбор вирусной массы проводили после максимального развития ЦПД в монослое после заражения. Для этого культуру клеток в матрасах замораживали при минус 20°C, размораживали при комнатной температуре при интенсивном встряхивании. Содержимую вирусную суспензию сливали в стерильную емкость по 150-200 мл и хранили при минус 20°C в замороженном состоянии до использования в работе.

Титр вируса в вирусодержащей культуральной жидкости определяли титрованием в пробирочной культуре клеток, для этого из исследуемой суспензии на поддерживающей среде готовили десятикратные разведения ($10^{-1} - 10^{-7}$) и каждым разведением суспензии заражали по 4 пробирочных культур клеток в дозе по 1 см³. Цитопатогенную активность вируса оценивали по срокам наступления, интенсивности развития ЦПД и титру накапливаемого вируса.

Для культивирования изолята CMLV были применены первичные и перевиваемые линии клеток, выращенные в пробирках и матрасах. Культуры клеток были выращены в средах Игла-МЕМ, DMEM содержащих 10% сыворотку крови крупного рогатого скота, а поддержание их проводилось в тех же средах с содержанием 2-% сыворотки крови крупного рогатого скота. Культивирование культур клеток и вируса проводили при 37⁰С стационарно. Определение чувствительности вируса оспы верблюдов к различным первичным и перевиваемым культурам клеток представлена на рисунке 2.

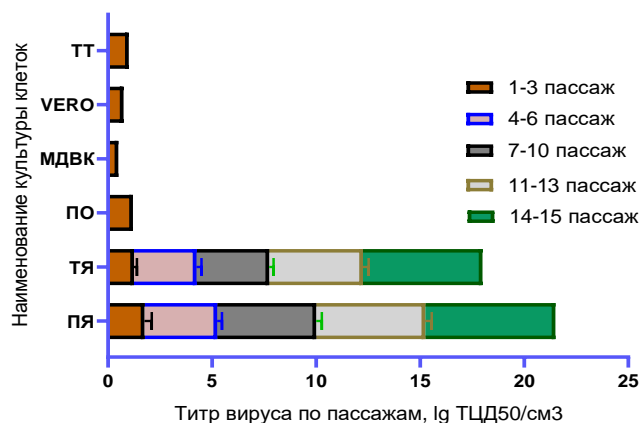


Рисунок 2 – Чувствительность вируса к первичным и перевиваемым культурам клеток

При первичных заражениях ЦПД вируса в культурах клеток ПЯ и ТЯ с первого до 3-го пассажа были в пределах 1,50-2,25 lgTCID₅₀/cm³.

В перевиваемых культурах клеток ПО, ТТ, Vero, МДВК аналогичные изменения отмечались позже на 1-2 суток, они развивались сравнительно медленно и на 7-8 сутки площадь монослой клеток с ЦПД всего достигала 30-40%. Интенсивность ЦПД возбудителя на втором пассаже в вышеуказанных перевиваемых клеточных линиях было менее заметным и слабым, а на третьем пассаже ЦПД уже не проявлялось.

Таким образом, в дальнейшем проводили дополнительные пассажи для адаптации вируса на первичных линиях культуры клеток ПЯ и ТЯ.

Данные по адаптации культур клеток приведены в рисунке 3.

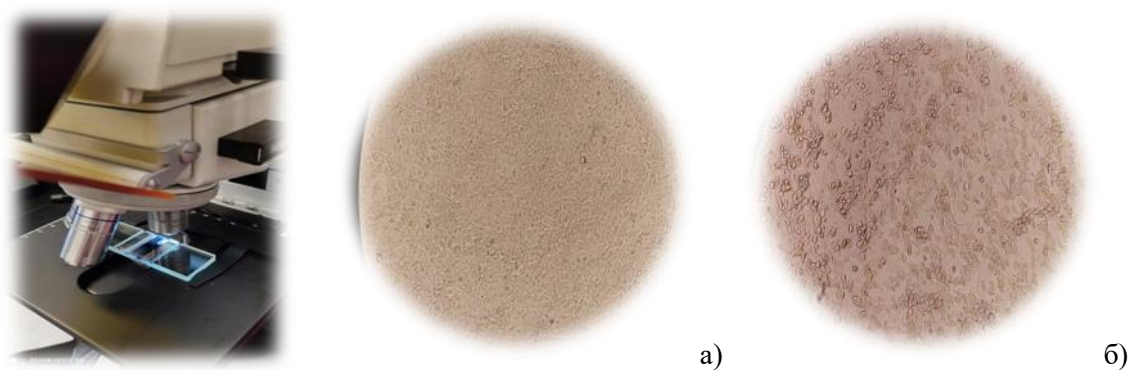


Рисунок 3 – а) Монослой культуры клеток ПЯ, б) После заражения на 2-3 суток

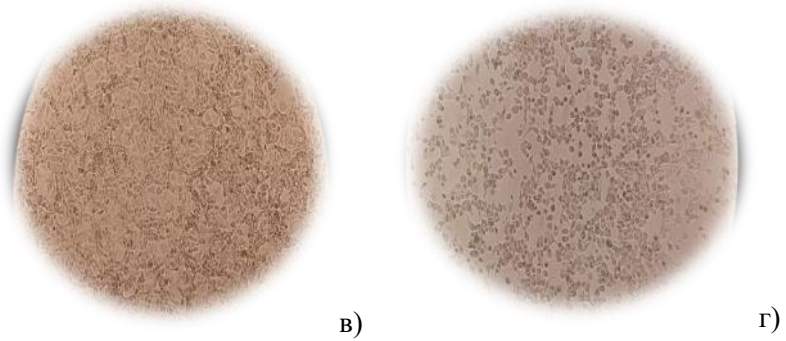


Рисунок 4 – в) После заражения на 3-4 суток, г) После заражения на 11-12 суток

Как видно из рисунков 3 и 4, культурах клеток ПО, ТТ, Vero, МДВК аналогичные изменения отмечались позже на 1-2 суток, они развивались сравнительно медленно и на 7-8 сутки площадь монослоя клеток с ЦПД достигала 30-40%. Интенсивность ЦПД возбудителя на втором пассаже в вышеуказанных перевиваемых клеточных линиях было менее заметным и слабым, а на третьем пассаже ЦПД уже не проявлялось.

Вирус оспы верблюдов в 15-ти последовательных пассажей репродуцировался и накапливался в культуре клеток ТЯ и ПЯ в титре в пределах $6,00-6,251g$ ТЦД_{50/см³}. Цитопатогенное действие вируса в монослое зараженных клеток проявлялся через 72-96 ч. после инфицирования и охватывал более 85% его площади в период между 110-144 ч.

Таким образом, результаты проведенных опытов показывают, что вирус оспы верблюдов из числа испытанных первичных и перевиваемых культур клеток наиболее чувствительным оказались линия клеток ПЯ и ТЯ (первичнотрипсинизированная культура). Репродукция вируса в этих клеточных культурах остается стабильной и при проведении 15-ти последовательных пассажей.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и электрофорез ДНК. Выделение ДНК из вирусосодержащей суспензии был проведен с использованием набора BloodandTissueKit (Qiagen) по методике производителя.

В изучении молекулярно-генетических характеристик выделенного изолята были использованы информации и программные утилиты «BLAST» и «Vector NTI 9.1.0». Для ПЦР-амплификации применялась плазмидная ДНК с маркерной вставкой. Результаты представлены на рисунке 5.

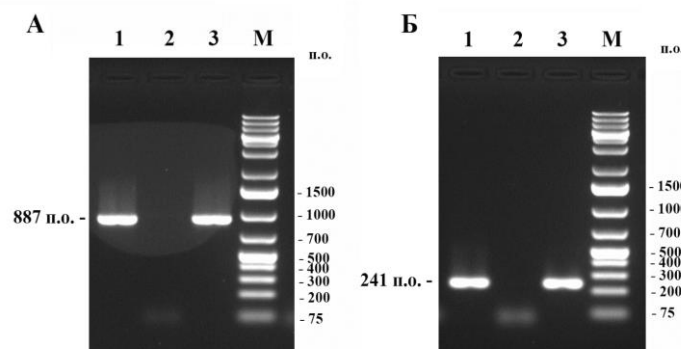


Рисунок 5 – Электрофоретический анализ в 1% агарозном геле продуктамплификации с использованием праймеров к ДНК вируса оспы верблюдов

Как видно из рисунка 5 (А), с родовыми праймерами к локусу *ATIP* ортопоксвирусов 887 п.н.составили, что подтверждает детекцию верблюжьей оспы. По размеру накопленных амплификатов, составляющих 241 п.о., на рисунке 5 (Б), свидетельствует, что исследуемый образец является видоспецифическим и соответствует вирусу оспе верблюдов. Анализу подверглись нуклеотидные последовательности геном вируса оспы верблюдов. При выравнивании генома вируса установлены потенциально консервативные участки. Сравнение этих локусов у различных типов вируса позволило выявить один максимально консервативный локус,

последующий BLAST-анализ установил его высокую специфичность к геному вируса оспы верблюдов, на этот локус выбрали праймеры и зонд. Кроме того, олигонуклеотидные затравки подобраны на три гена, входящих в геном верблюдов, наименее гомологичные специфичным олигонуклеотидам. Праймеры и зонд использованы в качестве внутреннего контроля амплификации. Для контроля хода амплификации разработан положительный контроль, имеющий нуклеотидную последовательность маркерной области генома вируса оспы верблюдов. В геноме вируса обнаружен высокий уровень полиморфизма относительно ПЦР-зонда. Устранить влияние такой вариабельности на количество вируса позволяют модификации ПЦР-зонда. Нуклеотидные последовательности праймеров, зондов и положительного контроля представлены в таблицах.

Идентификация образца ДНК, выделенной из изолята, была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента АТГена, с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GeneBank.

Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами:

- F 5' – ААТАСААГГАГГАТСТ-3 и ОIЕ_R

- 5' СТТААСТТТТТСТТТСТС-3 в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 15 нг ДНК, 1Ед. TaqDNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 10x*КCl буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 6 минут; 35 циклов: 94°C – 30 секунд, 55°C - 30 секунд, 72°C - 1 мин; заключительная элонгация 9 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора SimpliAmp ThermalCycler (Applied Biosystems).

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК, проводили методом разделения фрагментов ДНК в 1,5% агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента - бромистого этидия, который был использован с целью дальнейшей визуализации ДНК. Электрофорез проводили в камере горизонтального электрофореза PowerPac, используя источник тока BioRad Electrophoretic bath. В качестве электродного буфера использовали 1-х ТАЕ буфер. В исследуемой пробе был амплифицирован специфический фрагмент, в отрицательном контроле ПЦР продукта не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии контаминации.

Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили, ферментативным методом используя, Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу ([Shrimp Alkaline Phosphatase](#), Fermentas). Реакцию секвенирование проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) Нуклеотидные последовательности были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqMan (DNASTar). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества). Полученные последовательности были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 2 – Анализа нуклеотидной последовательности гена АТ

Наименование штамма	Последовательность фрагмента АТГена	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) алгоритм BLAST		
		Инвентарный Номер GeneBank (Accession number)	Наименование штамма	% совпадения
M-0001	СТСТСАСГТТАСТАСГТТСАГА ТТССААТТСАСГТТЦГААТГГГТ ТАССТССГСАГТТТТАСТАГСГ АТТТТАСГТТССАГАТСАСГТТС АГССТТСАТГСГТСТТСССТСТ СТАТСГАГТТТАТСАГАГСАГТС ТТТТТГААГГСАТЦГААСТССА ТАААТТТСТССААСТТТТГАТТ ГТТТСССТТТААСТТАТТАССТ	<u>KP768318.1</u>	Camelpoxvirus	100

CCTCAGAAGATGTTCCGTTACCG TTGCGTTTACACTCGTTAAGTTG TCTATCAAGATCCATGATTCTAT CTCTAAGACGTTGCATTTCTTTC CGTATCAGCATTGCTTTCATAAT TACGTCTGCAGTCACTCAATTGT CTTCAAGATCTGAGATTCTATC TCTAAGACGTCGCATCTCTCTCT GTTTCGGCATTGGTCTCATTATT ACGTCTACAGTCGTTCAACTGTC TTTCAAGATCTGATATTCTAGAT TCGAGTCTGCTAATCTCTGTAAC ATTTCCACGGCATTCAATTCAGTT GTCTTTCAAGATCTGAGATTCTA GATTGGAGTCTGCTAATCTCTGT AAGATTTCCCTCCGCTCTCGA TGCAGTCGGTCAACTTATTCTCT AGTTCTCTAATACGCGAACGCA GTGCATCAACTTCTTGCGTGTCT TCCTGGTTGCGTGTACATTCATC GAGTCTAGATTTCGAGATCTTTAA CGCGTCGTCGTTCTTCCCTCAAGT TCTCTGCGTACTACAGAAAGCGT GTCCCTATCTTGTTGATATTTAG CAATTTCTGATTCTAGAGTACTG ATTC			
--	--	--	--

Принимая во внимание базы данных, свидетельствующие о наличии в международных банках нуклеотидных последовательностей GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), мы дополнительно проводили построение филогенетических деревьев с нуклеотидными последовательностями АТІгенов референтных штаммов данных видов. В анализ были включены нуклеотидные последовательности АТІ гена, филогенетически наиболее связанных микроорганизмов.

Для построения филогенетических деревьев использовали программное обеспечение - Mega 11. Использовали алгоритм Muscle для выравнивания нуклеотидных последовательностей, построение древ проводили с использованием метода присоединения ближайших соседей Neighbor - JoiningNJ, (рисунок - 6).

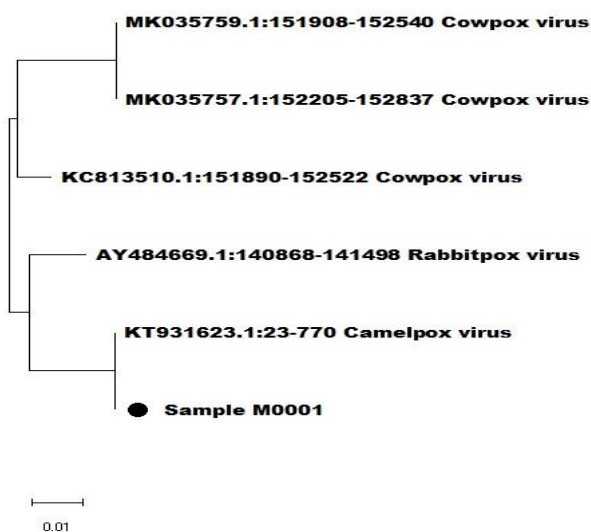


Рисунок 6 – Филогенетическое дерево гена АТІобразца М0001

Как видно на рисунке 7, образец «M0001» расположен на одной ветви с представителем CMLV (*Camelpoxvirus*). Учитывая максимальный процент совпадения анализируемой последовательности в международной базе данных по алгоритму BLAST, а также результатов филогенетического анализа установлено, что образец «M0001» относится к CMLV. Таким образом нами получен штамм CMLV «M0001», кандидата для изготовления вакцины против оспы верблюдов. Штамм CMLV используемой для накопления биомассы возбудителя был получен путем репродукции его монослойной культуре клеток ТЯ и ПЯ в титре 6,00-6,25 lg ТЦД_{50/см³}, соответственно, поддерживаемой в лабораторных условиях.

Заключение. Вирус оспы верблюдов, «M-0001» был выделен из оспенных пораженных участков кожного покрова от больного верблюда. Результаты проведенных опытов показывают, что к изоляту выделенного CMLV из числа испытанных первично-трипсинизированных культур клеток наиболее чувствительным оказались линия клеток ПЯ и ТЯ, в перевиваемых клеточных линиях ЦПД вируса было менее заметным и слабым, а в дальнейшем пассаже ЦПД уже не проявлялось. Штамм вируса оспы верблюдов «M0001», используемой для накопления биомассы возбудителя был получен путем репродукции его монослойной культуре клеток ПЯ и ТЯ в титре 6,00-6,25 lg ТЦД_{50/см³}, поддерживаемой в лабораторных условиях. Результаты ПЦР свидетельствует, что исследуемый образец по размеру накопленных амплификатов, составляющих 241 п.о., является видоспецифическим и соответствует вирусу оспе верблюдов. Учитывая максимальный процент совпадения анализируемой последовательности в международной базе данных по алгоритму BLAST, а также результатов филогенетического анализа установлено, что образец M0001 относится к *Camelpox virus*, (инвентарный номер GeneBank KP768318.1).

В дальнейшем будет создан экспериментальный образец вакцины из выделенного и охарактеризованного вируса оспы верблюдов.

Благодарность: Эта работа была поддержана Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан: за №04/8-21-29 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий» 2021-2023 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Diriba, A. B., Review on Camel Pox: Epidemiology, Public Health and Diagnosis[Text] / A. Diriba // ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences. - Vol. 5. Issue 4. -2019. – P. 22-33 - ISSN No. 2455-2518. - DOI: <http://dx.doi.org/10.20431/2455-2518.0504003> www.arcjournals.org.
- 2 Diriba, A.B. Review on Camel Pox: Epidemiology, Public Health and Diagnosis[Text] / A.B.Diriba // ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences. - DOI: 10.20431/2455-2518.0504002. – 2019. - P. 9-21.
- 3 Asmare, K. The first isolation and molecular characterization of Camel poxvirus in Ethiopia [Text] / Asmare, K., E. Skjerve, // Antiviral Research. -2013.23: - P.45-52.
- 4 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.915475/full>.
- 5 OIE-WAHIS 2020. Disease situation: Camelpox. Available online at: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>.
- 6 Balamurugan, V. Camelpox, an emerging orthopox viral disease[Text] / V. Balamurugan, G. Venkatesan, V. Bhanuprakash, RK Singh [and etc.]// Indian J Virol. – 2013. 24. - P. 295–305.
- 7 Duraffour, S. Camel poxvirus [and etc.]// S. Duraffour, H. Meyer, G. Andrei and Snoeck, R. Antiviral Research. -2011. 92. - P.167-186.
- 8 Оспа верблюдов Variola camelina // <http://zhivotnovodstvo.net.ru/maloizvestnye-zaraznye-bolezni-zhivotnyh/1962-ospa-verblyudov-variola-camelina.html>
- 9 Camelpox, an emerging orthopox viral disease.// URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3832703/>
- 10 Monique É. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Text] / É. Monique // OIE, Office International des Epizooties. - 2021.
- 11 Camelpox virus infection causes a severe generalized disease in camels and dromedaries that is characterized by extensive skin lesions // <https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/camelpox>
- 12 Camel viral diseases: Current diagnostic, therapeutic, and preventive strategies// <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.915475/full>
- 13 CAMELPOX// https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.02_CA_MELPOX.pdf

- 14Camelpox Virus// <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/camelpox-virus>
- 15 Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems// URL:<https://virusjour.elpub.ru/jour/article/view/598/373>.
- 16 Строгонова, И.Я. Использование в вирусологии культуры клеток[Text]/ И.Я.Строгонова, А.А.Трухоненко// Методические указания. Красноярский государственный аграрный университет. Красноярск. - 2013. – 48 с.
http://www.kgau.ru/sveden/2017/ipbivm/mu_360501_9.pdf.
- 17 [Культивирование вирусов //https://online.zakon.kz](https://online.zakon.kz)
- 18 [Методы культивирования вирусов //http://vmede.org/index.php?Topic=584.0](http://vmede.org/index.php?Topic=584.0).
- 19 Культивирование вирусов.Методы//<https://farmf.ru/lekicii/kultivirovanie-virusov-metody/>
- 20PureLink Genomic DNA Mini Kit//<https://www.biochemmack.ru/catalog/element/14314/29494/>
- 21 Набор для подготовки библиотеки ДНК NEBNext® Ultra™ для Illumina®// <https://international.neb.com/products/e7370-nebnext-ultra-dna-library-prep-kit-for-illumina#Product%20Information>
- 22Познакомьтесь с ведущей в мире программной платформой для биоинформатики // <https://www.geneious.com/>

REFERENCES

- 1 Diriba, A. B. Review on Camel Pox: Epidemiology, Public Health and Diagnosis[Text] / A. Diriba // ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences. - Vol. 5. Issue 4. -2019. – P. 22-33 - ISSN No. 2455-2518. - DOI: <http://dx.doi.org/10.20431/2455-2518.0504003> www.arcjournals.org.
- 2 Diriba, A.B. Review on Camel Pox: Epidemiology, Public Health and Diagnosis[Text] / A.B.Diriba // ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences. - DOI: 10.20431/2455-2518.0504002. – 2019. - P. 9-21.
- 3 Asmare, K.The first isolation and molecular characterization of Camel poxvirus in Ethiopia [Text] / Asmare, K., Skjerve, E. // Antiviral Research. -2013.23: - P.45-52.
- 4 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.915475/full>.
- 5 OIE-WAHIS 2020. Disease situation: Camelpox. Available online at: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>.
- 6 Balamurugan, V. Camelpox, an emerging orthopox viral disease[Text] / V.Balamurugan,G.Venkatesan, V.Bhanuprakash, RK. Singh[and etc.]// Indian J Virol. – 2013. 24. - P. 295–305.
- 7 Duraffour, S.Camel poxvirus [and etc.]// S.Duraffour, H.Meyer, G.Andrei, and R. Snoeck, Antiviral Research. -2011. 92. - P.167-186.
- 8 Оспа верблюдов Variola camelina // <http://zhivotnovodstvo.net.ru/maloizvestnye-zaraznye-bolezni-zhivotnyh/1962-ospa-verblyudov-variola-camelina.html#>.
- 9Camelpox, an emerging orthopox viral disease.// <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3832703/>
- 10 Monique É. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Text] / É. Monique // OIE. Office International des Epizooties. - 2021.
- 11 Camelpox virus infection causes a severe generalized disease in camels and dromedaries that is characterized by extensive skin lesions // URL:<https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/camelpox>
- 12Camel viral diseases: Current diagnostic, therapeutic, and preventive strategies// <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.915475/full>
- 13CAMELPOXhttps://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.02_CAM_ELPOX.pdf
- 14Camelpox Virus// <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/camelpox-virus>
- 15 Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems// <https://virusjour.elpub.ru/jour/article/view/598/373>.
- 16 Stroganova, I.Ya.The use of cell culture in virology [Text] /I.YaStroganova, A.A.Trukhonenko [and etc.] //Methodological guidelines. Krasnoyarsk State Agrarian University. – Krasnoyarsk. - 2013. – 48 p.
- 17 [Cultivation of viruses // https://online.zakon.kz](https://online.zakon.kz)

18 Methods of virus cultivation // <http://vmede.org/index.php?Topic=584.0>.
19 Cultivation of viruses. Methods // <https://farmf.ru/lekcii/kultivirovanie-virusov-metody/>
20 Pure Link Genomic DNA Mini Kit // <https://www.biochemmack.ru/catalog/element/14314/29494/>.
21 DNA library preparation kit NEBNext® Ultra™ для Illumina® // <https://international.neb.com/products/e7370-nebnext-ultra-dna-library-prep-kit-for-illumina#.Product%20Information>
22 Discover the world's leading bioinformatics software platform // <https://www.geneious.com/>

РЕЗЮМЕ

Түйе шешегі-теріде және шырышты қабаттарда тән түйіндік-пустулярлы шешек бөртпесінің пайда болуымен жүретін жұқпалы ауру. Патогендер-покс вирустары тобындағы ірі эпителиотропты вирустар. Инкубациялық кезең түйелердің жасына, вирустың қасиеттеріне және оның ағзаға ену жолдарына байланысты 3-тен 15 күнге дейін өзгереді: жас жануарларда

4-7, ересектерде 6-15 күн. «М-0001» түйе шешек вирусы, түйенің тері астынан шешек ауруынан зардап шеккен аймақтарынан «Ветеринария жөніндегі ұлттық референттік орталық» бөлінді. Жүргізілген эксперименттік жұмыстардың нәтижесінде түйе шешегіне қарсы вакцина жасауға үміткер "M0001" түйе шешек штаммының негізгі вирусологиялық және молекулалық-генетикалық сипаттамалары зерттелді. ПТР нәтижелері 241 п.о. құрайтын жинақталған амплификаттардың мөлшері бойынша зерттелетін үлгінің түрге тән екенін және түйе шешек вирусына сәйкес келетінін көрсетеді. BLAST алгоритмі бойынша халықаралық дерекқорда талданатын реттілік сәйкестігінің максималды пайызын, сондай-ақ филогенетикалық талдау нәтижелерін ескере отырып, M0001 үлгісі *Camelpox virus* -қа (Gene Bank нөмірі KP768318.1) қатысты екені анықталды. Жүргізілген тәжірибелердің нәтижелері сыналған бастапқы трипсинделген жасуша өсінділерінің ішінен оқшауланған CMLV изолят үшін ең сезімтал қозылардың бүйрегі мен қозы тестикуласының жасуша сызығы екенін көрсетеді, трансплантацияланған вирустың цитопатиялық әсері жасушалық сызықтарында аз байқалды және әлсіз болды, ал үшінші пассажда вирустың цитопатиялық әсері мүлдем көрінбеді.