



Хонь, ямааны цэцгийн вирусын вакцины омгийг vero эсэд дасгасан дүн

Э.Батмагнай¹, Г.Ариунболд¹, Д.Эрдэнэчимэг¹, Ё.Энхмандах¹, С.Өсөхгэрэл²,
Б.Мөнхгэрэл², Б.Болдбаатар^{1*}

¹-Мал эмнэлгийн хүрээлэн, ХААИС, Улаанбаатар, Монгол Улс

²-Мал эмнэлгийн эмийн сорилт баталгаажуулалтын улсын лаборатори, Улаанбаатар, Монгол Улс

*Холбоо барих хаяг: boldoomglvet@yahoo.com

ХУРААНГУЙ

Хонь, ямааны цэцгийн вируст өвчин халдвар, тархалт өндөртэй бөгөөд өвчлөл, хорогдлын түвшин өндөр байгаа нь манай улсын эдийн засагт сөргөөр нөлөөлж байна. Манай улс Биокомбинат (Био-үйлдвэр) үйлдвэрт хонины цэцэг өвчний эсрэг вакциныг хурганы төмсөгний анхдагч эдэд өсгөвөрлөх замаар амьд вакцин, ямааны цэцэг өвчний эсрэг вакциныг ямаанд халдвар хийж ам, хамрын орчинд үүссэн шархны эдийг химийн бодисоор идэвхгүйжүүлэх замаар тус тус үйлдвэрлэж байна. Ялангуяа хонины цэцэг өвчний вакциныг зөвхөн мал төллөх хаврын цагт үйлдвэрлэх боломжтой байдаг нь өвлийн цагт гарсан өвчнийг хянах аргагүйд хүрч байна. Иймээс цаг хугацаанаас хамааралгүй вакцин үйлдвэрлэхэд дамжмал эсийн технологи хэрэглэх зайлшгүй шаардлагатай байна. Оросын VNIIZJ омог ашигласан 2 төрлийн хонины цэцгийн амьд вакцин, Хятадын ямааны цэцгийн амьд вакцин (серийн дугаар 010030) шингэлж, Vero эсийн өсгөвөрт халдаасан. Стандарт ПГУ-аар үр дүнг шалгаж, ABI3130xl sequencer машинаар үүсгэгчийн нуклеотидын дарааллыг тодорхойлсон ба MEGA7 програмаар дарааллуудыг харьцуулж удам зүйн мод байгуулсан. Эсэд халдвар хийснээс 3 хоногийн дараа хонины цэцэг, 4 хоногийн дараа ямааны цэцэг CPE (cytopathic effect) буюу эс эмгэгшүүлэх нөлөө тус тус үзүүлсэн бөгөөд 6 хоногийн дараа хоёулаа бүрэн CPE үзүүлсэн байна. Эдгээр вирус агуулсан эсийн тэжээлт орчноос бид вирусын ДНХ ялгаж Биокомбинат-ын хонины цэцгийн Перего омгийг эерэг хяналт болгон ашиглаж ПГУ-ын шинжилгээг явуулсан. ПГУ-ын бүтээгдэхүүн бүгд адилхан, 289 хос суурийн урттай байсан. Хонь, ямааны цэцгийн вирусын ДНХ-ийн нуклеотидын дарааллыг харьцуулж үзэхэд хонины цэцгийн вирусын бүтэн геномтой 92%, ямааны цэцгийн вирусын бүтэн геномтой 90% адилхан байв. Бид эдгээр өвчний үүсгэгчийг Vero эсэд халдвар хийх нөхцлийг тогтворжуулсан нь дамжмал эсийн өсгөвөрт суурилсан амьд вакцины түүхий эдийг ихээр бэлтгэх боломжтой боллоо.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: эсийн өсгөвөр, эсийн эмгэгшил, днх дараалал, амьд вакцин

ОРШИЛ

Хонь, ямааны цэцэг өвчин Поксвирусийн язгуурын Каприпокс төрлийн үүсгэгчээр үүсгэгдэнэ. [1] Хонь, ямааны цэцэг өвчний үүсгэгч нь ийлдсэн нэг хэвшилтэй, бусад төрлийн амьтдыг өвчлүүлдэггүй. Уг вирус нь тоосгон, гонзгой дөрвөлжин буюу зууван

хэлбэртэй, ДНХ агуулсан, 300X270X200 нм хэмжээтэй байдаг.[2] Цэцэг өвчний үүсгэгч бусад вирусийг бодвол гадаад орчин, малын бие махбод, түүхий эдэд удаан хугацаагаар идэвхээ хадгалдаг. Малыг гоц халдварт хонины цэцэг өвчин нь дэлхий

дахинд эдийн засгийн ихээхэн хохирол учруулдаг, худалдаа наймааны хориотой өвчний тоонд ордог. [3] Дэлхийн мал амьтны эрүүл мэндийн байгууллагад 2008 болон 2009 онд Монгол орон хонины цэцэг өвчин эрсдэл бүхий улсын тоонд бүртгэгдсэн байна. Анх 2006 онд Сэлэнгэ аймгийн Асгат, Баруун-урт сумдад хонины цэцэг гарснаас хойш зүүн бүсийн аймгуудад голомтлон гарч тухайн өвчинтэй тэмцэх, урьдчилан сэргийлэхэд асар их хохирол үзүүлж байна. Дэлхий даяар хонины цэцэг өвчнөөс сэргийлэх зорилгоор уг өвчний амьд болон идэвхгүйжүүлсэн вакциныг эсийн анхдагч болон дамжмал өсгөвөрт өсгөвөрлөж бэлтгэдэг. Манай оронд хурганы төмсөгний анхдагч эсийн өсгөвөр ашиглан хонины цэцэг өвчний вакциныг зөвхөн хаврын улиралд мал төллөх үеэр бэлтгэдэг нь хавраас бусад улиралд өвчин гарсан үед вакцин их хэмжээгээр үйлдвэрлэх

боломжгүйд хүрч байна. Үүнээс үүдээд цэцэг өвчний дэгдэлтийг хянах, өвчингүй эрүүл бүс бий болгоход асуудал тулгарч байна. Гиймээс бид хонины цэцэг өвчний эсрэг эсийн өсгөвөрт амьд вакцин бэлтгэхийн тулд үүсгэгчийг дамжмал эсэд халдаах, дасгах ажлыг хийж гүйцэтгэлээ. Энэхүү сэдэвт ажлын үндсэн зорилго нь хонины цэцгийн үүсгэгчийг шугаман эсэд дасгах, өсгөвөрлөх цаашид амьд вакцины түүхий эдийн нөөц бэлтгэн туршихад оршино. Дээрх зорилгын дагуу амьд вакцин (хонины цэцгийн эсийн өсгөвөрт амьд вакцин, ямааны цэцгийн эсийн өсгөвөрт амьд вакцин)-ий омгийг Vero дамжмал эсийн өсгөвөрт халдаан өсгөвөрлөж, эсийн шингэний масс хурааж авах, халдвартай эсийн шингэн дэх вирусыг молекул биологийн аргаар баталгаажуулах гэсэн 2 зорилтуудыг тавин ажиллаа.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АРГА ЗҮЙ

Хэрэглэгдсэн материал:

Амьд вакцин

- Хонины цэцгийн эсийн өсгөвөрт амьд вакцин /Орос, ВНИИЗЖ/
- Ямааны цэцгийн эсийн өсгөвөрт амьд вакцин /Хятад, Jinyu Baoling/

Эсийн өсгөвөр

- Африкийн ногоон сармагчингийн бөөрний эс (Vero)

Дээрх шугаман эсийг дараах материалууд ашиглан тэжээлт орчинг бэлтгэн өсгөвөрлөсөн. Үүнд:

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium-*Gibco, America*

FBS- Fetal Bovine Serum-*Sigma, America*

EDTA- EthyleneDiamineTetraacetic Acid disodium salt dihydrate -*Sigma, America*

Glutamin-L- *Sigma, America*

Tripsin- *Sigma, America*

Antibiotics (Ichiro Takatori., 2001)

Дээж боловсруулах арга:

Хонины цэцэг, Ямааны цэцгийн амьд вакцинаас боловсруулалтыг дараах аргаар хийв. Хонины цэцэг, Ямааны цэцгийн амьд вакциныг 1 мл PBS-ийн уусмал нэмж, цийдмэгийг 0,45 микрометрийн шүлтүүрээр шүүн 1,5 мл-ийн тубед хуваан савлаж буцааж

-80° хэмд хөлдөөн хадгалсан. Үүнийг эсийн өсгөвөр халдаахад хэрэглэсэн.[4], [5]

Хонины цэцгийн амьд вакциныг эсийн өсгөвөрт халдаасан арга:

Эсийн өсгөвөрийн 25 см³ хэмжээтэй матрицанд Vero эсийг жигд бүрэн ургасны дараа эсийн шингэнийг соруулж асган, 3 мл PBS-ээр угаагаад урьдчилан боловсруулсан хонины цэцгийн амьд вакцины цийдмэгээс 0,5-1,5 мл хэмжээтэйгээр эсэд халдаасан. Халдвар хийсэн эсийг 37°C-ийн CO₂ бүхий термостатад 15 минутын турш 1 удаа чагт үүсгэн холих замаар 1 цаг тавьж инкубацласан. Цаг болсны дараа 2%-ийн хээлийн ийлдэс агуулсан DMEM-ээс зохих харьцаагаар нэмж хонуулсан. Эсийн эмгэгшилийг 24-72 цагийн хооронд өндөр, нарийн нягтшилтай микроскопоор шалган зургийг авч баталгаажуулсан. Сөрөг хяналт болгох үүднээс жигд ургалттай Vero эсийг авч үхрийн 2%-ийн хээлийн ийлдэс агуулсан DMEM-ээс зохих харьцаагаар нэмж хонуулсан.

Ямааны цэцгийн амьд вакциныг эсийн өсгөвөрт халдаасан арга:

Эсийн өсгөвөрийн 25 см² хэмжээтэй матрицанд Vero эсийг жигд бүрэн ургасны

дараа эсийн шингэнийг соруулж асган, 3 мл PBS-ээр угаагаад Ямааны цэцгийн амьд вакциныг 1 мл ариун PBS-д шингэлэн 0.5 мл хэмжээтэйгээр эсэд халдаана. Халдвар хийсэн эсийн өсгөвөрийг 37°C-ийн CO₂ бүхий термостатад 15 минутын турш 1 удаа чагт үүсгэн холих замаар 1 цаг тавьж инкубацласан. Цаг болсны дараа үхрийн 2%-ийн хээлийн ийлдэс агуулсан DMEM-ээс зохих харьцаагаар нэмж хонуулсан. Эсийн эмгэгшилийг 24-72 цагийн хооронд өндөр, нарийн нягтшилтай микроскопоор шалган зургийг авч баталгаажуулсан. Сөрөг хяналт болгох үүднээс жигд ургалттай VERO эсийг авч үхрийн 2%-ийн хээлийн ийлдэс агуулсан DMEM-ээс зохих харьцаагаар нэмж хонуулсан.[6]

Ялган авсан үүсгэгчийг молекул биологийн аргаар баталгаажуулах ДНХ ялгах:

Эмгэгшил үзүүлсэн эсийн өсгөвөрийн шингэнээс ДНХ-г нийтэд хэрэглэгддэг арга зүйн дагуу фенол, хлороформын аргаар ялгасан.

СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН

Өсгөвөржилт, эсийн эмгэгшил:

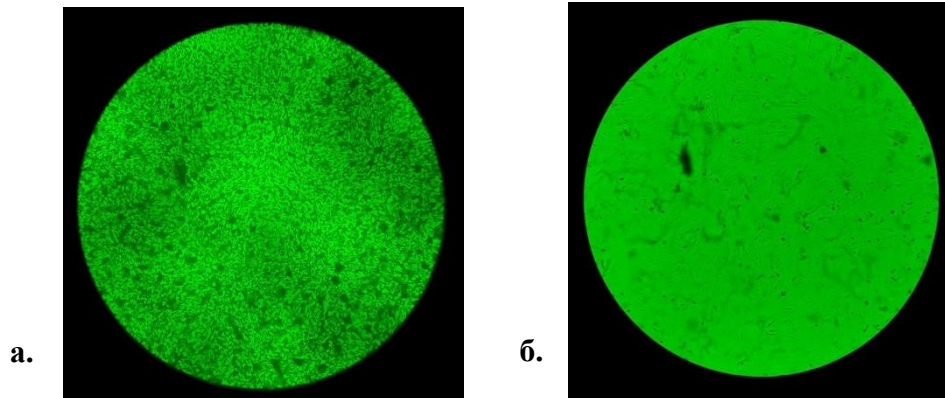
Зураг 1-ээс харахад Хонины цэцгийн халдаасан (а) болон сөрөг хяналтын (б) өсгөвөртэй харьцуулахад 3 хоногийн дараагаас мэдэгдэхүйц ялгаатай CPE (эс эмгэгшүүлэх нөлөө) үүсгэж байгаа нь ажиглагдаж байна. Мөн Зураг 2-оос харахад ямааны цэцгийн халдаасан (а) болон сөрөг хяналтын (б) өсгөвөртэй харьцуулахад 4 хоногийн дараагаас мөн мэдэгдэхүйц ялгаатай CPE үүсгэж байгаа нь ажиглагдаж байна.

Полимеразын Гинжин Урвал /ПГУ/:

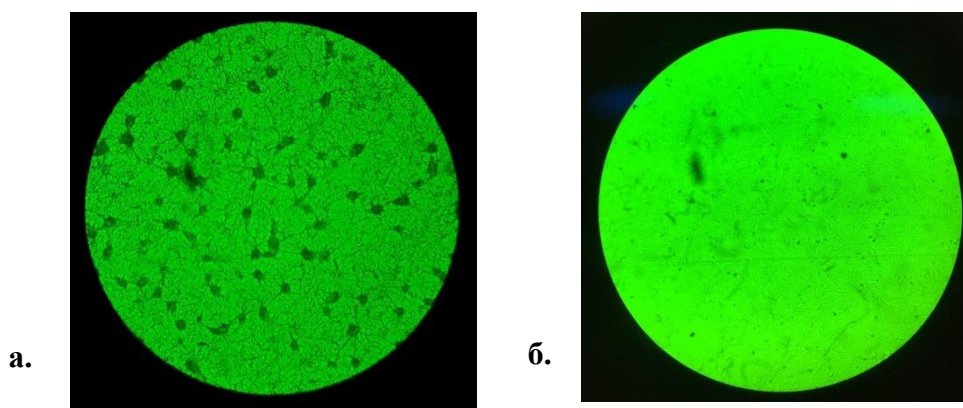
Ялгасан ДНХ-г Ins-1F (5'-CAC-CCG-TCT-TCA-GGG-CTT-CTT-GGT-TT-3') болон Ins-1R (5'-CAT-TTC-ACC-ATC-TGG-TTG-GCT-GGC-TC-3') хос праймер ашиглан 94 ° C-д 20 сек, 55 ° C-д 20 сек, 72 ° C-д 20 сек турш 40 удаагийн давтамжтайгаар праймер холбогдох, 72 ° C-д 15 минут уртасгах [7], [8], [9] зарчмаар ПГУ-ыг явуулсны дараа эцсийн бүтээгдэхүүнийг 1.5%-ийн агорозын гель, TAE буфер ашиглан гүйлгэж, этидиум бромидээр будан трансиллюминаторт харж, үр дүнг уншсан. Бүтээгдэхүүний урт 289 хос суурь юм. Эерэг хяналтаар Биокомбинат-д үйлдвэрлэсэн хонины цэцгийн эсийн өсгөвөрт вакциныг шингэлэн ДНХ ялган полимеразын гинжин урвалаар шинжиллээ. **ДНХ-ийн дараалал тодорхойлох ба удам зүйн мод байгуулсан нь:** ABI3130xl sequencer машинаар үүсгэгчийн нуклеотидын дарааллыг нийтэд мөрддөг арга зүйн дагуу тодорхойлсон ба MEGA7 програмаар дарааллуудыг харьцуулж удам зүйн мод байгуулсан.

Молекул биологийн баталгаажуулалт:

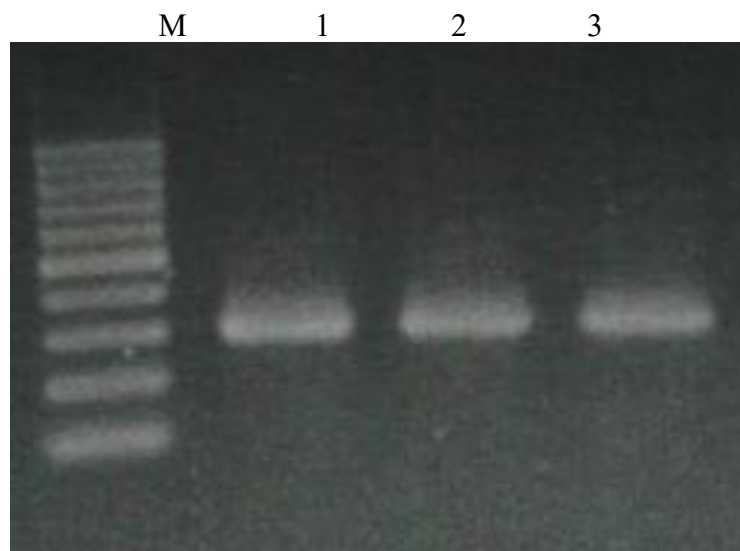
Зураг 3-т цэцэг өвчний вакцины омгийг ПГУ-ын аргаар шалгахад хонины цэцэг (1), ямааны цэцэг (2) өвчний амьд вакцины омог халдаасан эсийн өсгөвөрийн шингэнийг Биокомбинат-д үйлдвэрлэсэн хонины цэцгийн амьд вакцины Перего омогтой (3) эерэг хяналтаар харьцуулан шалгахад бүгд 289 хс урттай ПГУ-ын судал үзүүлэв. Үүгээр хонь ямааны цэцгийн омгийг VERO эсийн өсгөвөрт амжилттай халдаасаныг баталгаажуулав. Мөн хонь, ямааны цэцгийн вирусын P32 генийн дарааллаар удамзүйн мод байгууллаа. (Зураг 4.)



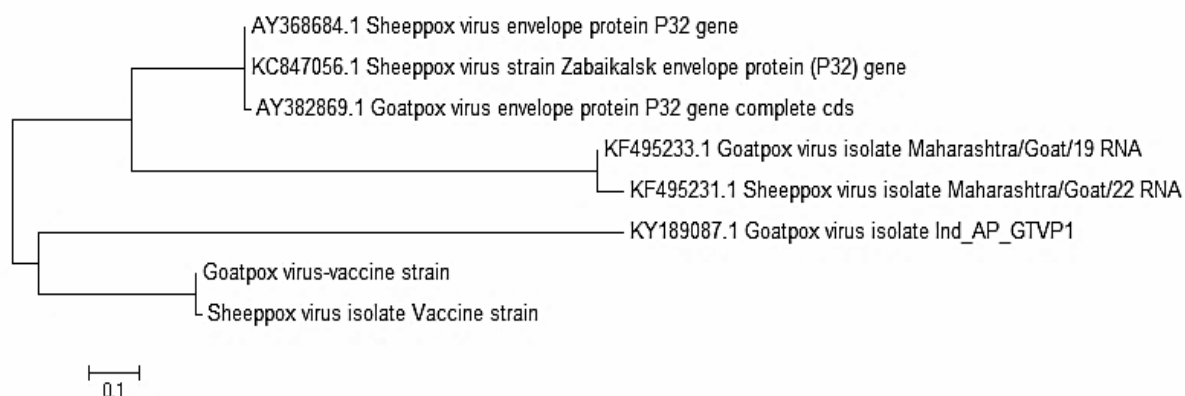
1-р зураг. Хонины цэцгийн халдаасан (а) болон сөрөг хяналтын (б) өсгөврийн зураг.



2-р зураг. Ямааны цэцгийн халдаасан (а) болон сөрөг хяналтын (б) өсгөврийн зураг.



3-р зураг. Цэцэг өвчний вакцины омгийг ПГУ-ын аргаар шалгасан дүн. Хонины цэцэг (1), ямааны цэцэг (2) өвчний амьд вакцины омог халдаасан эсийн өсгөврийн шингэнийг Биокомбинат-д үйлдвэрлэсэн хонины цэцгийн амьд вакцины Перего омгийг (3) эерэг хяналтаар харьцуулан шалгав. /289 хс/



4-р зураг. Хонь, ямааны цэцгийн вирусын P32 генийн дарааллаар удамзүйн мод байгуулсан нь

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Хонь, ямааны цэцэг өвчин халдварлалт, тархалт өндөртэй бөгөөд өвчлөл, хорогдлын түвшин өндөр байгаа нь манай улсын эдийн засагт сөргөөр нөлөөлж байна. Манай оронд хурганы төмсөгний анхдагч эсийн өсгөвөр ашиглан хонины цэцэг өвчний вакциныг бэлтгэж байгаа нь өвчин гарсан үед олон тооны хурганы төмсөг олдох боломж хомс байгаа нь өвчин гарсан үед вакциныг их хэмжээгээр үйлдвэрлэх боломжгүйд хүрч байна. Үүнээс үүдээд цэцэг өвчний дэгдэлтийг хянаж эрүүл бүс бий болгоход асуудал тулгарч байна. Тиймээс бид хонины цэцэг өвчний эсрэг эсийн өсгөвөрт амьд вакцин бэлтгэхээр зорилоо. Хонь, ямааны

цэцгийн вирусууд нь ийлдэс судлал, эмгэг жам, эмнэлзүйн шинж тэмдэгүүдээр ялган оношлоход хэцүү бөгөөд зөвхөн орчин үеийн молекул биологийн аргаар ялгаварлан оношлох боломжтой. Бидний гаргасан хонь, ямааны цэцэг өвчний вирусын дараалал нь бусад судлаачдын гаргасан P32 гений дараалалтай харьцуулж үзэхэд Энэтхэгийн Ind-AP-GTVP1 гадаргуугийн уургийн P32 генийн дараалалтай хамгийн төстэй байлаа. Хонь, ямааны цэцгийн вирусын дарааллууд нь газар нутгийн хувьд ойролцоо байдлаас хамаарч нуклеотидын дарааллаар ойролцоо байгаа нь харагдаж байна. (Зураг 4) .[10]

ДҮГНЭЛТ

Хонь, ямааны цэцгийн амьд вакцины омгийг Африкийн ногоон сармагчингийн эсэд халдааж, халдвартай шингэнээс ДНХ ялган ПГУ-аар олшруулж, удамзүйн мод байгуулж үзэхэд хонины цэцгийн бүтэн дараалалтай 92% төстэй, ямааны цэцгийн вирус бүтэн дараалалтай 90% төстэй байгаа нь халдвар хийсэн цэцэг өвчний вирус эсийн өсгөвөрт

амжилттай өсгөвөрлөгдсөн болохыг баталж байна. Халдвар хийснээс хойш 6 хоногийн дараа хонь, ямааны цэцгийн вирусээр Vero эсэд бүрэн эсийн эмгэгшил (CPE) үзүүлж байгаа нь цаашид энэ дамжмал эсэд хонь, ямааны цэцгийн вирусыг дахин халдаах замаар вирус агуулсан эсийн шингэний масс хураах боломжтойг харуулж байна.

ТАЛАРХАЛ

Энэхүү ажлыг хийж гүйцэтгэхэд зааж чиглүүлж өгсөн Вирус судлалын лабораторийн эрхлэгч Б.Болдбаатар болон

хамтран гүйцэтгэсэн лабораторийн хамт олондоо талархал илэрхийлье.

АШИГЛАСАН ХЭВЛЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

- [1] Б.Баярцэцэг, Хонь, ямааны цэцгийн вакцины сөөлжих идэвхийг сорьсон дүн, Магистрын ажил, дугаар-56505, хуу: 10-11, 2015.
- [2] Ц.Базарцэрэн, Б.Болдбаатар, Мал амьтдын вируст өвчин III, хуу:179-187, 2002.
- [3] Bhanuprakash., et al., A Classical Live Attenuated Vaccine for Sheep Pox. J. Tropical Animal Health and Production. 36 pp 307-320, 2004
- [4] Sarkar J, Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermo stability of all live-attenuated PPR vaccine Vaccine 21, pp 4728-4735, 2003
- [5] Ichiro Takatori., Manual for cell culture pp 21-27, 2001.
- [6] Brain, W.J. and Hiilar, O.K. Virology Methods Manual., pp 37-43, 1996
- [7] O. Mangana-Vougiouka et al. 1998 Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures Journal of Virological Methods 77, pp 75–79, 1999
- [8] O. Mangana-Vougiouka et al. Sheep poxvirus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay. Mol. Cell Probes 14: pp 305-310, 2000
- [9] P. Markoulatos O. Mangana-Vougiouka et al. Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction Journal of Virological Methods Volume 84, Issue 2, pp 161-167, 2000
- [10] Carn, V.M., Control of capripox virus infections. J. Vaccine, 11, pp 1275-1279

The result of propagation of sheep and goat pox viral vaccine strains into vero cells

Batmagnai E.¹, Ariunbold G.¹, Erdenechimeg D.¹, Enkhmandakh Yo.¹,
Munkhgerel B.², Usukhgerel S.², Boldbaatar B.^{1*}

¹-Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

²-State Veterinary Drug Quality Control laboratory, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: boldoomglvet@yahoo.com

Background: Sheep and goat pox viral disease, which affects negatively to our country's economy by prevalence and infection, has high mortality and morbidity rate. Although our country manufactures sheep and goat pox viral vaccine using lamb's testicle tissue in the Biocombinat (Biofactory), in winter, there is high number of diseased animals, lamb testicle is scarce, therefore there is a need to produce cell-culture based sheep and goat pox vaccine.

Materials and methods: Russian VNIIZJ strain type 2 sheep pox vaccine and Chinese goat pox live vaccine (serial number 010030) antigens were used after 20 times of dilution and propagated into Vero and BHK-21 cell culture. By PCR the result was examined and sequenced by ABI3130xl sequencer machine and sequences were compared by MEGA7 program

Results: 3 days after infection sheep pox and 4 days after infection goat pox were shown CPE (cytopathic effect or cytopathogenic effect) respectively, 6 days after the infection both of them has been shown full CPE. From these infected materials we isolated viral DNA and run PCR assay using Biocombinat's strain as a positive control. PCR products were all equal, 289 bp long. When we compare these DNA sequences of sheep and goat pox viruses, they were 92% identical to complete genome of Indian sheep and goat pox virus.

Conclusion: We can produce cell-culture based live vaccine and diagnostic tests for sheep and goat pox viral disease by re-propagating these strains into Vero.

KEY WORDS: Cell culture, cytopathic effect(CPE), DNA sequence, alive vaccine