

Кенжебаева М.К., Матраимов М.Б., Мамбеталиев М.

**НЬЮКАСЛ ООРУСУНА ВИРУСТУН ТЕРМОТУРУКТУУ ҮЛГҮСҮН АЛУУ ЖАНА
ИММУНОБИОЛОГИЯЛЫК КАСИЕТИН ИЗИЛДӨӨ**

Кенжебаева М.К., Матраимов М.Б., Мамбеталиев М.

**ПОЛУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ВАРИАНТА ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ
БОЛЕЗНИ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

M.K. Kenzhebaeva, M.B. Matraimov, M. Mambetaliev

**GETTING THERMOSTABLE NEWCASTLE DISEASE VIRUS VARIANTS AND
STUDYING OF IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES**

УДК: 578.831.9.

Макалада Ньюкасл оорусуна «Ла-Сота» ата-элик штаммынан вирустун термостабилдүү үлгүсүн 56⁰С температурада көп жолу кайнатуунун негизинде өнүгүп жаткан тоок эмбриондорунда (ӨТЭ) изилдөө жүргүзүү көрсөтүлгөн. Кайнатуунун жыйынтыгында «Ла-Сота» штаммы, жогорку температурага жана анын тийгизген таасирине көз карансыздыгын көрсөтүп, өзүнүн биологиялык жана гемагглютиндүү активдүүлүгүн жогорку титрларда жоготкон жок. Ньюкасл оорусунун вирусунан каршы «Ла-Сота» штаммынын алынган термотуруктуу үлгүсү иммуногендүү жана өз учурунда реактогендүү эмес штамм болуп чыгып, жыйынтыгында иммунобиологиялык касиети боюнча штаммдын баштапкы үлгүсүнөн кем эместигин көрсөтүп.

Негизги сөздөр: штамм «Бор-74 ВГНКИ», штамм «Ла-Сота», Ньюкасл оорусу, титрлөө, вирус, вакцина, термотуруктуулук, иммуноген.

В статье представлены результаты получения термостабильного варианта вируса Ньюкаслской болезни из родительского штамма «Ла-Сота» путем многократной обработки вируса при температуре 56⁰С перед каждым пассированием на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и данные по его иммуногенности для птиц при интраназальном введении. В результате термической обработки, не зависимо от экспозиции высокой температуры (от 5 до 150 мин) и кратности ее воздействия, штамм «Ла-Сота» сохранил биологическую и гемагглютинирующую активности в высоких титрах. Полученный термостабильный вариант штамма «Ла-Сота» вируса НБ в испытанной дозе является иммуногенным, не реактогенным штаммом и по иммунобиологическим характеристикам не уступает исходному образцу штамма.

Ключевые слова: штамм «Бор-74 ВГНКИ», штамм «Ла-Сота», болезнь Ньюкасла, титрование, вирус, вакцина, термостабильность, иммуноген.

The article presents the results of obtaining thermostable variant of Newcastle disease virus from the parental strain "La Sota" by repeated treatment of the virus at 56⁰С before each passaging on developing chicken embryos (DCE) and the data on its immunogenicity for the birds when administered intranasally. Because of heat treatment, regardless of the exposure of high temperature (from 5 to 150 min) and the multiplicity of its effects, the strain "La Sota" preserved biological and hemagglutinating activity in high titers. The resulting heat-stable version of the strain "La Sota" NB virus in the tested dose is immunogenic without strain reactogenicity and immu-

nobiological characteristics is not inferior to the original sample strain.

Key words: strain «Bor-74 VGNKI», strain «la Sota», Newcastle disease, titration, virus, vaccine, thermostability, immunogen.

Введение

Среди инфекционных болезней, наносящих значительный экономический ущерб птицеводству, особое место занимает Ньюкаслская болезнь (НБ) из-за его высокой контагиозности [1]. Для специфической профилактики НБ в угрожаемых и неблагополучных зонах применяют преимущественно живые вирус вакцины, создающие защиту в более короткие сроки, чем инактивированные вакцины.

В Республике Казахстан, в зависимости от реактогенности применяемых вакцин, для профилактики НБ практические ветеринарные специалисты птицеводческих хозяйств южных и юго-западных областей отдают предпочтение вирус вакцине из штамма «Ла-Сота», а северных и северо-восточных – из штамма «Бор-74 ВГНКИ» [2].

Успешная профилактика заболеваний птиц с помощью вирус вакцин зависит от ряда факторов, одним из которых является стабильность биологических свойств агента (штамма) в течение жизненного цикла вакцины. Нарушения температурного режима хранения и транспортировки препаратов от изготовителя до потребителя («холодовой цепи») могут быть причиной низкой эффективности их применения [3]. Потенциальная опасность малоэффективной вакцинации, связанной с неудовлетворительной термостабильностью препаратов, возрастает при применении их в южных районах страны, где нельзя исключить воздействие повышенных температур.

В связи с этим, целью настоящей работы было получение термостабильного варианта штамма «Ла-Сота» вируса НБ, используемого для изготовления вакцин против данной инфекции.

Материалы и методы

В эксперименте использован штамм «Ла-Сота» вируса НБ с биологической активностью (8,75±0,12) Ig ЭИД₅₀/мл. Термическую обработку штамма проводили в водяной бане путем прогревания при 56⁰С в

течение 10, 20, 30 мин 1-4 пассажи; 30, 40, 60 мин 5-9 пассажи; 60, 90 мин 10-14 пассажи, 90, 120 мин 15-40 пассажи и 120-150 мин 41-60 пассажи на РКЭ. Затем вирус инокулировали в аллантаоисную полость 11-суточных РКЭ и инкубировали при 37⁰С в течение 72 час. После чего отбирали наиболее устойчивые к нагреванию выжившие варианты вируса. Термостабильность клонов штамма «Ла-Сота» вируса НБ различного пассажного уровня проверяли в реакции гемагглютинации (РГА) [4] и титрованием в РКЭ. Иммуногенность полученного термостабильного варианта вируса НБ проверяли на птицах 2-4 мес возраста путем интраназального введения в дозе 10⁵ЭИД₅₀. Наличие иммунитета у них против вируса НБ определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) [4] по уровню антигемагглютининов в

сыворотках крови на 21 сут., а напряженность иммунитета - путем контрольного заражения вирулентным штаммом «Томилинский-53» вируса НБ интраназальной дозе 10⁵ ИД₅₀.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина [5].

Результаты и обсуждение

Для получения термостабильного варианта штамма «Ла-Сота» вируса НБ проведены работы по термической обработке вируса при 56 °С в зависимости от пассажного уровня в течение 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, и 150 мин с последующим пассированием вируса в РКЭ (1-60 пассажи).

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Биологическая и гемагглютинирующая активности пассажных материалов штамма «Ла-Сота» вируса болезни Ньюкасла до и после обработки температурой 56 °С

Пассажный уровень штамма Ла-Сота	Экспозиция температуры, мин	Гемагглютинирующая и биологическая активности вируса после термообработки		Гемагглютинирующая активность вируса в титрованной пробе, log ₂	Существенность различий в биологической активности вируса, P
		log ₂	Ig ЭИД ₅₀ /мл		
контроль	Исходный образец штамма Ла-Сота с биологической активностью (8,75 ± 0,12) Ig ЭИД ₅₀ /мл, гемагглютинирующей активностью 1:512				
1	10	1,67±0,33	10,25±0,14	5,67±0,33	P<0,001
2		1,33±0,33	10,00±0,14	9,67±0,33	P<0,001
1	20	1,67±0,33	11,08±0,22	3,67±0,33	P<0,001
5		10,67±0,88	10,25±0,14	8,33±0,33	P<0,001
1	30	1,67±0,33	10,08±0,22	3,67±0,33	P<0,005
5		9,67±0,88	10,00±0,00	10,0±0,00	P<0,001
5	45	8,67±0,88	9,08±0,08	8,67±0,33	P<0,10
10		8,67±0,88	8,83±0,08	7,33±0,88	P>0,50
5	60	8,67±0,33	8,83±0,08	11,00±0,58	P>0,50
10		8,00±0,57	8,00±0,14	7,33±0,88	P<0,02
5	90	5,00±0,58	8,41±0,17	9,67±0,33	P<0,20
10		9,67±0,88	8,00±0,14	10,0±1,0	P<0,10
15		7,33±0,33	8,25±0,14	9,67±0,88	P>0,05
20		5,67±0,33	10,0±0,08	11,00±0,58	P>0,20
25		8,33±0,33	8,50±0,14	9,67±0,88	P<0,20
30		10,33±0,33	7,87±0,12	9,00±0,58	P<0,005
35		9,33±0,33	6,87±0,12	7,33±0,88	P<0,001
40		9,67±0,88	8,83±0,08	7,33±0,33	P>0,50
10	120	9,33±0,33	8,00±0,14	5,67±0,33	P<0,025
15		7,33±0,33	8,00±0,14	8,67±0,33	P<0,025
20		8,33±0,33	9,75±0,14	9,67±0,88	P>0,05
25		9,00±0,58	8,50±0,14	9,67±0,88	P>0,20
30		9,67±0,88	8,75±0,14	10,00±0,58	0
35		10,33±0,33	7,87±0,12	6,00±0,58	P<0,001
40		8,00±1,155	8,75±0,14	8,00±0,58	0
45		8,67±0,33	8,50±0,25	9,67±0,88	P>0,20
50		9,67±0,88	9,00±0,12	9,67±0,33	P>0,40
55		9,67±0,88	8,83±0,08	10,0±1,0	P>0,50
60	8,33±0,33	9,00±0,12	8,67±0,33	P>0,40	
45	150	7,00±0,58	8,75±0,14	7,33±0,88	0
50		9,67±0,88	8,83±0,08	8,67±0,33	P>0,50
55		9,67±0,88	9,00±0,14	9,33±0,88	P>0,40
60		9,67±0,33	9,00±0,12	9,33±0,33	P>0,40

Примечание - «0» - существенность различий не отмечено

Из данных таблицы 1 видно, что в результате термической обработки, не зависимо от экспозиции высокой температуры (от 5 до 150 мин) и кратности ее воздействия (в течение 60 последовательных пассажей), штамм «Ла-Сота» сохранил биологическую и гемагглютинирующую активности в высоких титрах ($8,75 \pm 0,12 - 11,08 \pm 0,08$ lg ЭИД₅₀/мл и $1,33 \pm 0,33 - 11,00 \pm 0,58$ log₂, соответственно). Однако биологическая активность штамма вируса при воздействии высокой температуры в течение 10, 20 и 30 мин в начальных пассажных уровнях существенно повысилась по сравнению с исходной активностью ($P < 0,001$) и сохранилась до 5 пассажного уровня (срок наблюдения).

Следует отметить, что от продолжительности термического воздействия и пассажного уровня (при экспозиции температуры в течение 60 мин на 10 пассажном уровне, при - 90 мин на 10, 30, 35 пассажных уровнях и при - 120 мин на 10, 15 и 35 пассажных уровнях) у штамма «Ла-Сота» отмечено существенное снижение биологической активности (на $0,75 - 1,88$ lg) $P < 0,001 - 0,005$). В дальнейшем по мере термообработки и пассирования его на РКЭ, биологическая активность на 40 пассажном уровне возросла до исходного титра и сохранялась до 60 пассажного уровня.

Таким образом, на основе полученных данных в РГА, а также титрам биологической активности на РКЭ нами получен термостабильный вариант штамма «Ла-Сота» вируса НБ, у которого титры биологической активности существенно не отличается от родительского штамма ($P > 0,20 - 0,50$). Возможность получения термостабильного иммуногенного варианта штамма вируса НБ подтверждает Nguyen Tien Dung [6].

В последующих опытах изучали иммуногенные свойства полученного термостабильного варианта штамма «Ла-Сота» на птицах, не содержащих в сыворотках крови антигемагглютининов к вирусу НБ. При этом штамм вируса инокулировали 10 курам 2-4 мес. возраста интраназально в дозе 10^5 ЭИД₅₀. Контролем служили 10 кур, привитые исходным образцом штамма «Ла-Сота» тем же методом и в той же дозе. За период наблюдения в течение 21 сут. негативных влияний вакцинации на птиц не отмечали. На 21 сут. у привитых птиц взяли сыворотки крови для определения уровня антигемагглютининов и провели контрольное заражение эпизоотическим штаммом «Томилинский-53» вируса НБ интраназально в дозе 10^5 ИД₅₀.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Иммуногенные свойства полученного термостабильного варианта (60 пассаж) штамма «Ла-Сота» вируса НБ

Вакцинация	Количество птиц, гол.	Титры антигемагглютининов в РТГА на 21 сут после иммунизации, log ₂	Результаты контрольного заражения
термостабильным вариантом штамма «Ла-Сота»	10	$5,20 \pm 0,249$	10/0
исходным вариантом штамма «Ла-Сота» (контроль)	10	$5,30 \pm 0,213$	10/0
контроль (интактные птицы)	10	не исследовано	10/10
Примечания: 1 числитель – количество птиц в опыте 2 знаменатель – количество заболевших или павших птиц			

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что у птиц, вакцинированных как термостабильным вариантом штамма «Ла-Сота» вируса НБ, так и его исходным образцом, на 21 сут уровень антигемагглютининов к данному вирусу существенно не отличается ($5,20 \pm 0,249$ и $5,30 \pm 0,213$ log₂, соответственно) ($P > 0,50$), т.е. на уровне предельно допустимому для поддержания необходимого иммунного статуса поголовья птиц ($4 - 5$ log₂) [7]. Контрольное заражение иммунизированных (20 гол) птиц показало невосприимчивость всех привитых образцами штамма «Ла-Сота» кур к эпизоотическому штамму вируса НБ (100 % иммунитет), когда интактные - заболели с проявлением клинических признаков, характерных для НБ и пали в течение 2-6 сут.

Таким образом, полученный термостабильный вариант штамма «Ла-Сота» вируса НБ в испытанной дозе является иммуногенным, не реактогенным

штаммом и по иммунобиологическим характеристикам не уступает исходному образцу штамма.

Выводы

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что штамм «Ла-Сота» вируса НБ не теряет гемагглютинирующую и биологическую активности до 60 пассажного уровня при температуре обработки 56°C в течение 120-150 мин;
2. Термический обработанный образец 60 пассажного уровня штамма «Ла-Сота» вируса НБ по своим иммунобиологическим характеристикам не уступает исходному образцу штамма.

Литература:

1. OIE, Office of International Epizootics, Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Newcastle disease //Trusczyński Eds. OIE standard commission publication, 2004 version, part 2, section 2.1 chapter 2.1.15.

2. Годовые отчеты отдела ветеринарии птицепрома и комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК за 1972-2014 гг. - 59 с.
3. Beard, C.W. Influence of environmental temperatures on serologic responses of broiler chickens to inactivated and viladge Newcastle disease vaccines / C.W.Beard, B.W. Mitchel // Avian Dis. 1987, -voe.31. -№2.- P. 321 - 326.
4. Сюрин, В.Н. Ветеринарная вирусология /В.Н.Сюрин, Р.В.Белоусова, Н.В.Фомина. - М: Колос, 1984. - 280-286, 317-322 с.
5. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях /И.П. Ашмарин. А.А.Воробьев - Л: Медицина, 1962. - 179 с.
6. NguyenTienDung. Immunogenic attenuated thermo-stable Newcastle disease virus. / Nguyen Tien Dung, Nguyen van Quang // Agr. Food Ind/ - 1992. -№9. –P.341-342.
7. OIE. 2012. Chapter 2.3.14. Newcastle disease, in: OIE terrestrial manual: manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organisationfor Animal Health. Paris. France.

Рецензент: к.биол.н. Кошематов Ж.К.
