

Нургазиева А.Р., Мамытова А.Т., Толубаева М.Т.

**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН АЙМАГЫНДА
БӨЛҮНҮП АЛЫНГАН НЬЮКАСЛ ЫЛАҢЫНЫН ВИРУСУН
ӨРЧҮТҮҮ ЫКМАЛАРЫН ИШТЕП ЧЫГУУ**

Нургазиева А.Р., Мамытова А.Т., Толубаева М.Т.

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА ВЫДЕЛЕННОГО НА
ТЕРРИТОРИИ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

A.R. Nurgazieva, A.T. Mamytova, M.T. Tolubaeva

**DEVELOPMENT OF METHODS FOR CULTIVATING
THE NEWCASTLE DISEASE VIRUS ISOLATED ON THE
TERRITORY OF THE KYRGYZ REPUBLIC**

УДК: 619:578. 835.1

Канаттуулардын Ньюкасл оорусу – клиникалык белгилери жок, эпизоотия, энзоотия жана тымызын вирусту алып жүрүүчү түрүндө кездешкен өтө жугуштуу оору. Ньюкасл оорусу канаттуулардын көп учурда дем алуу органдарына, сейрек – ашказан ичегилерге зыян келтирген ылаңы. Оорулуу канаттуулар оор түрүндө 100% өлүшөт, жана жумуртка өндүрүү 45-60% га чейин азайган. Бул иш А.Дүйшеев атындагы Кыргыз илим изилдөө институтунун вирусология жан биотехнология лабораториясында аткарылган. Изилдөөнүн максаты ньюкасл оорусунун вирусунун штаммынын өрчүтүү жана сактоо жөнүндө ыкмаларын иштеп чыгуу болуп саналат. Ньюкасл ылаңын вирусун өстүрүү ыкмаларынын изилдөөдө тажрыйбада «Ла-Сота» табигый азайтылган лентогендик вакцинанын штаммы жана «Н» мезогендик штамм колдонулган. Өстүрүүнү өрчүтүп келе жаткан тооктун эмбрионунда жасалган, анткени ал вирустарды жана кээ бир бактерияларды өстүрүүдө жана диагностикада жөнөкөй жана ишенимдүү ыкмаларынын бири катары бул ишке ашырылган.

Негизги сөздөр: мезогендик, штамм, өрчүгөн токтун эмбриону, вакциндик штамм, титр, аллантоистик көңдөй. Ла-Сота, вакцина.

Ньюкаслская болезнь псевдоочума птиц – высококонтагиозная инфекция, протекает в виде эпизоотий, энзоотий и скрытого вирусоносительства без клинических признаков. Болезнь Ньюкасла вызывает заболевание птиц, у которых чаще поражаются респираторные органы, реже – желудочно-кишечный тракт. При тяжелом течении гибнет до 100% больной птицы, яйценоскость снижается до 45-60%. Работа была выполнена в Кыргызском научно-исследовательском институте ветеринарии им А.Дүйшеева, в лаборатории вирусологии и биотехнологии. Целью исследования является отработка методов поддержания и культивирования штамма вируса болезни Ньюкасла. В опытах по освоению методов культивирования вируса

болезни Ньюкасла использовали природно-ослабленные лентогенные вакцинные штаммы «Ла-Сота» и мезогенный штамм «Н». Культивирования проводили в развивающихся куриных эмбрионах, так как это как один из наиболее простых и надежных методов культивирования и диагностики многих вирусов и некоторых бактерий.

Ключевые слова: мезогенный, штамм, развивающийся куриный эмбрион, вакцинный штамм, титр, аллантоическая полость, Ла-Сота, вакцина.

Newcastle disease of birds is a highly contagious infection that occurs in the form of epizootic, enzootic, and latent virus carriers without clinical signs. Newcastle disease causes disease in birds, whose respiratory organs are more often affected, and less commonly the gastrointestinal tract. In severe cases, up to 100% of sick birds die, egg production decreases to 45-60%. The work carried out at the Kyrgyz Scientific Research Institute of Veterinary Medicine named after A. Duysheev, in the laboratory of virology and biotechnology. The aim of the study is to develop methods for maintaining and cultivating a strain of the Newcastle disease virus. In experiments on the development of methods for cultivating the Newcastle disease virus, the naturally attenuated La Sota vaccine strains and the mesogenic strain H were used. Cultivations were carried out in developing chicken embryos, as this is one of the simplest and most reliable methods for the cultivation and diagnosis of many viruses and some bacteria.

Key words: mesogenic strain, developing chicken embryo, vaccine strain, titer, allantoic cavity, La-Sota, vaccine.

Введение. Болезнь Ньюкасла – одна из самых массовых инфекций, трудно поддающихся контролю. Вирус болезни Ньюкасла по вирулентности варьирует от авирулентных, мезогенных до высоковирулентных штаммов, что связано с разной протеолитической активностью гликопротеидов. К болезни Ньюкасла вос-

приимчивы куры, цыплята, вирус хорошо культивируется в РКЭ. Многие штаммы индуцируют интерферон. Источником инфекции является больная птица. Заражение происходит контактным путем, а также через пищевые отходы и воду. Высоковирулентные штаммы накапливаются во всех органах, но более всего в трахее, легких, селезенке, головном мозге.

Вакцинированная или переболевшая птица приобретает иммунитет, напряженность и продолжительность которого зависит от возраста птицы, биологических свойств и способа введения вируса в организм. Для специфической профилактики применяют инактивированные, живые и генно-инженерные вакцины.

Материалы и методы. Исследования проводили в лаборатории вирусологии и биотехнологии с использованием серологических, молекулярно биологических биотехнологических методов.

Перед заражением куриных эмбрионов содержимое ампул с вирусосодержащим материалом разводили стерильным физиологическим раствором хлористого натрия в зависимости от исходной биологической активности от 10^{-3} до 10^{-5} ($10^5 - 10^6$ ЭИД₅₀ в 1 см³) и вводили в АП 10 сут РКЭ в объеме 0,1 см³. Заражение эмбрионов проводили в соответствии с описанными в литературе методиками через шприц с иглой, вводя ее на глубину 10-12 мм от поверхности скорлупы.

Инфицированные эмбрионы инкубировали в термальной комнате в течение 72 ч. Овоскопирование зараженных яиц проводили каждые 12ч. Гибель эмбрионов в первые 24ч считали неспецифической эти эмбрионы утилизировали и при окончательной оценке результатов не учитывали. Эмбрионы, погибшие через 24ч и более часов после заражения помещали в холодильник при температуре $(3 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и сохраняли до окончания опыта. Эмбрионы, оставшиеся живыми в течение 72 ч, по истечении этого срока охлаждали в

холодильнике не менее 10ч.

Как показало овоскопирование, при культивировании в РКЭ штаммов «Ла-Сота» гибели эмбрионов в процессе инкубирования практически не наблюдается. При культивировании же штамма «Н» и особенно штамма гибель эмбрионов, вызванная размножением вируса, начинается уже через 24ч после заражения и к 48-60 ч живых эмбрионов не остается. Поэтому в дальнейших исследованиях при выращивании этих двух штаммов вируса НБ промежуток времени между овоскопированиями был сокращен до 6-8 ч., иначе в условиях инкубации происходит быстрое разложение погибших эмбрионов и потеря качества вирусосодержащего сырья с последующей его выбраковкой.

После окончания сроков инкубации и охлаждения эмбрионы вскрывали и отбирали АЖ. Пробы АЖ, давшие положительный результат в качественной РГА, оценивали по гемагглютинирующей активности путем ее тестирования в качественном варианте этой же реакции, а также определяли титр инфекционности на куриных эмбрионах. Для этого по общепринятым методам готовили последовательные 10-кратные разведения АЖ на физиологическом растворе хлористого натрия. Каждым разведением вирусосодержащей суспензии заражали по четыре 10 - сут РКЭ в аллантоисную полость в объеме 0,1 см³. Инкубирование инфицированных эмбрионов и учет результатов проводили как описано выше.

Результаты исследования. В целом, при отработке метода культивирования вируса НБ было получено и оценено по гемагглютинирующей и биологической активностям 5 партий вирусосодержащей суспензии штамма «Ла-Сота», по 3 партии штаммов «Н». Обобщенные характеристики вирусосодержащего сырья, полученного при культивировании вируса НБ, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Основные характеристики вирусосодержащего сырья вируса НБ при культивировании в РКЭ (X⁺m)

Штаммы вируса	Кол-во изученных проб, n	Титры гемагглютинации	Титры инфекционности, lgЭИД ₅₀ /см ³
«Ла-Сота»	5	1:128-1:2048	10,00±0,31
Вирус БН	3	1:64-1:512	9,90±0,23

Данные таблицы 1 позволили заключить, что испытанная система культивирования вакцинных и вирулентного штаммов вируса НБ в РКЭ при описанных выше условиях их инфицирования и инкубирования обладает удовлетворительной репродуктивной способностью к вирусу НБ и позволяет получать вирусосодержащее сырье с биологической активностью не менее $10^{9,0}$ ЭИД₅₀/см³ и титрами гемагглютинации 1:64 и выше.

Согласно литературным данным, вирусосодержащие суспензии с такими характеристиками пригодны для изучения свойств вирусов, а также для использования в качестве исходного сырья для изготовления вакцинных и диагностических препаратов против этой болезни.

Для оценки иммунобиологических характеристик размноженных штаммов вируса НБ был проведен опыт, в котором нативным вирусосодержащим сырьем штаммов «Ла-Сота» (выбор этого штамма был обоснован потребностям птицеводческих хозяйств республики в вакцинных препаратах из этих штаммов), руководствуясь действовавшим наставлениями по применению соответствующих вакцин, были иммунизированы интраназально по 20 цыплят 25-сут возраста. Для определения безвредности вирусосодержащих материалов этим же методом была введена 10-кратная доза вируса (по 10 цыплят на каждый штамм). В течение 16 сут после введения материалов за цыплятами вели клиническое наблюдение. Отклонений от физиологической нормы за этот период не наблюдали. Через 16 сут цыплят, привитых иммунизирующими дозами вирусов и 20 цыплят интактных (контроль) подвергли заражению эпизоотическим штаммом ви-

руса НЮ внутримышечно в дозе 10^5 ЭЛД₅₀. Все вакцинированные обоими штаммами цыплята в течение 10 сут наблюдения остались здоровыми, в то время как контрольные заболели и пали от НБ в течение 3-5 сут после заражения.

После установления этих характеристик штаммы вируса в виде матриксных серий были лиофилизированы и заложены на хранение для использования в дальнейших научных целях.

Заключение. В наших исследованиях было установлено высокая иммуногенность размноженных вакцинных штаммов вируса болезни Ньюкасла, их безвредность для цыплят, а также эффективность контрольного (вирулентного) штамма вируса для проверки напряженности иммунитета против болезни Ньюкасла, создаваемого изученными вакцинными материалами.

Литература:

1. Hamaguchi M., T Yoshida K., Nishikawa. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. Virology -1983.
2. Morgan R.W., GelbJ., Schreurs J. Protection of chickens from Newcastle and Marek's disease with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. Avian Dis-1992.
3. Plamadela S., SBlidariuI., BaadiuD. La sota and LS79 Newcastle vaccines: Novel data. Note II Some Lasota and LS79 vaccine batches potency control upon-shelf life termination Stud.Res.Vet.Med. Pasteur Inst. -1992.
4. Alexander D.J. Newcastle disease and other Paramyxoviridae infections Rev. Sci. Tech.-2000.-V. 19.-№2.-P.443-462.
5. USMAN M (2002) Effects of vaccination of chickens against Newcastle disease with thermostable V4 and Lasota vaccines using different grains and their brans as vehicle.
6. Сюрин В.Н., Белоусова, Фомина Н.В. Диагностика вирусных болезней животных. - М., 1991.