

ОТРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА В РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

¹ Р. З. Нургазиев, доктор ветеринарных наук, профессор

² А. Р. Нургазиева, кандидат биологических наук

² Е. Д. Крутская, кандидат ветеринарных наук

¹ А. И. Боронбаева, кандидат биологических наук

¹ М. Т. Толубаева, кандидат ветеринарных наук

¹ Кыргызский национальный аграрный университет
им. К. И. Скрябина, Бишкек, Кыргызстан

² Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии им. А. Дуйшеева, Бишкек,
Кыргызстан

E-mail: nurgazieva10@gmail.com

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла, велогенные и мезогенные подтипы, культивирование, РГА, куриные эмбрионы, штамм, вакцина

Реферат. Болезнь Ньюкасла регистрируется на всех континентах земного шара, кроме Австралии, и вызывает большие экономические потери в птицеводстве. В Кыргызской Республике вспышки болезни Ньюкасла отмечены в 2015 и 2016 гг. Несмотря на то, что возбудитель болезни Ньюкасла достаточно изучен, известны особенности течения вызываемой им инфекции, но проблема ликвидации инфекции остается пока нерешенной. В наших исследованиях мы изучали и отработывали оптимальные условия культивирования выделенного штамма вируса болезни Ньюкасла в развивающихся куриных эмбрионах. Для этого проводили заражения куриных эмбрионов различными дозами. Разведениями вируса от 10^{-1} до 10^{-8} инфицировали 10-суточные развивающиеся куриные эмбрионы в аллантоисную полость в объеме 0,1 и 0,2 см³ (дозы от $6 \cdot 10^4$ до 0,6 ЭИД₅₀ (50 %-я эмбриональная инфекционная доза) на эмбрион и от $1,2 \cdot 10^5$ до 1,2 ЭИД₅₀ на эмбрион соответственно). Уровень накопления вируса оценивали в количественной реакции гемагглютинации (РГА) по титрам его гемагглютининов в аллантоисной жидкости. Титры гемагглютининов при разведениях от 10^{-1} до 10^{-8} вирусосодержащего материала свидетельствует, что при объеме инокулируемого вирусосодержащего материала 0,1 см³ накопление гемагглютининов штамма вируса болезни Ньюкасла происходит на высоком уровне и существенно не различается ($P > 0,5$) при использовании для заражения развивающихся куриных эмбрионов разведений вируса до 10^{-6} (доза в данном случае ~ 60 ЭИД₅₀).

APPROPRIATE CONDITIONS FOR CULTIVATING THE STRAIN OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS IN THE DEVELOPING HEN EMBRYOS

¹ Nurgaziev R.Z., Doctor of Veterinary Sc., Professor

² Nurgazieva A.R., Candidate of Biology

² Krutskaja E.D., Candidate of Veterinary Sc.

¹ Boronbaeva A.I., Candidate of Biology

¹ Tolubaeva M.T., Candidate of Veterinary Sc.

¹ Kyrgyz State Agrarian University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyzstan

² Kyrgyz Research Centre for veterinary science named after A. Duysheev, Bishkek, Kyrgyzstan

Key words: Newcastle disease, velogenic and mesogenic subtypes, growing, hemagglutination test, hen embryos, strain, vaccine.

Abstract. Newcastle disease is observed and detected on all the continents of the globe, except Australia, and causes great economic losses in poultry production. In the Kyrgyz Republic, Newcastle disease outbreaks were observed in 2015 and 2016. Regardless Newcastle's pathogen is well explored, there are specific features of disease course and the problem of infection elimination is not solved. The authors explored the appropriate conditions for growing Newcastle's virus in developing hen embryos. For this the researchers infected chicken embryos with different doses: 10⁻¹ to 10⁻⁸ viral propagation was applied for 10-day developing chicken embryos into the allantoic cavity in the volume of 0.1 and 0.2 cm³ (doses of 6,10⁴ to 0.6 50% embryonic infectious dose (EID₅₀) per embryo and 1.2-10⁵ to 1.2 50% embryonic infectious dose (EID₅₀) per embryo, respectively). The degree of virus accumulation was estimated by means of hemagglutination test according to the titers of hemagglutinins in the allantoic fluid. The titers of hemagglutinins in solutions within 10⁻¹ to 10⁻⁸ of virus-containing material shows that at volume of an inoculated virus-containing material of 0,1 cm³ accumulation of hemagglutinins of a Newcastle virus strain occurs at high level and does not essentially differ ($P > 0,5$); when applied for infecting developing chicken embryos of virus cultivation to 10⁻⁶ (a dose in this case ~ 60 50 % an embryonic infectious dose EID₅₀).

Болезнь Ньюкасла (БН) является контагиозной, широко распространенной и вызывает серьезные экономические потери домашней птицы. Международное эпизоотическая бюро (МЭБ) причисляет ее к подлежащим уведомлению болезням и налагает ограничения и торговые эмбарго на страны и районы, где происходят вспышки БН.

Вирус БН (ВБН) имеет весьма обширный круг хозяев: он поражает огромное количество различных видов птиц, передается перназальным или пероральным путем. Заболевание, вызываемое ВБН, протекает с разной интенсивностью и обладает разной способностью к передаче. Основываясь на тяжести протекания болезни, выделяют три патотипа ВБН: лептогенная ветвь вызывает весьма умеренное плохо детектируемое респираторное заболевание, мезогенная ветвь проявляется в нервных и респираторных расстройствах, вызывая умеренную смертность, велогенная ветвь вызывает тяжелые кишечные или неврологические повреждения, приводя к высокой смертности (до 100% цыплят) [1].

Предварительный диагноз на БН ставят на основе эпизоотологических, клинических и патоморфологических данных. Однако значительная вариабельность симптоматики и патоморфологических поражений у инфицированной вирусом БН птицы диктует

необходимость подтверждения первичного диагноза изоляцией и идентификацией возбудителя, а также установления у заболевшей птицы сероконверсии к последнему. Точная диагностика вируса требует комбинирования различных методов, таких как анализ клинических симптомов (в том числе и гистологический анализ), выделение и наработка вирусного материала и серологический анализ.

В основе профилактики болезни Ньюкасла птиц лежат неспецифические и специфические средства защиты и методы их выполнения. Неспецифическая защита обеспечивается организационными мероприятиями и строгим соблюдением общих ветеринарно-санитарных норм и правил. Специфическая защита основана на применении вакцинных препаратов. Активная иммунизация птицы против болезни Ньюкасла различными вакцинными штаммами и методами их применения в настоящее время является одним из наиболее распространенных и эффективных способов профилактики. Вакцины против БН представлены двумя видами: живые и инактивированные [2-4].

Однако спорадические вспышки заболевания все еще регистрируются. Интенсивные вспышки болезни Ньюкасла произошли в Кыргызстане в 2015 и 2016 гг., которые сопровождалась большими потерями домашней

птицы. Результаты проведенных исследований показали, что выделенные изоляты ВБН 2015 г. в Кыргызской Республике принадлежат к субгенотипу VIIId класса II БН, сходному со многими изолятами, полученными в других странах.

Цель исследования – отработка оптимальных условий культивирования имевшегося в наличии мезогенного штамма ВБН, обеспечивающих максимальное его накопление в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В Кыргызском научно-исследовательском институте ветеринарии были проведены исследования по отработке оптимальных условий культивирования ВБН в РКЭ. Образцы были получены из неблагополучных хозяйств. В аллантоисную полость 10-дневных куриных эмбрионов были инокулированы 20% гомогенизированных образцов. Объем супернатанта 0,2 мл. После инкубации в течение трех дней при 37 °С аллантоисные жидкости испытывали на реакции гемагглютинации (РГА) в соответствии с Руководством ВОЗ по диагностике и наблюдению за птичьим гриппом. Аллантоисные жидкости с отрицательными результатами применялись для вторичной инокуляции. В исследовании были использованы куриные эмбрионы, полученные из инкубатора, инкубированные в термостате при температуре 37 °С и влажности 60–70%. Эмбрионы 9–11-дневного возраста заражали, вводя по 0,2 мл вирусосодержащего материала в аллантоисную полость. Для этого в скорлупе на стороне зародыша на 5–6 мм выше границы воздушной камеры делали отверстие диаметром около 1 мм. Иглу вводили параллельно продольной оси на глубину 10–12 мм. После инъекции отверстие в скорлупе закрывали. Индикация выделенного вируса была проведена в РГА [5-7].

Реакция гемагглютинации проведена в соответствии с руководством ВОЗ по диагностике и контролю болезни Ньюкасла. РГА используется с целью определения наличия

вируса в исследуемом материале и его титрования. Гемагглютинины входят в состав вирусной частицы (вириона) и могут содержаться в инфицированных вирусом аллантоисной и амниотической жидкостях, оболочках и органах куриного эмбриона; в легких, печени и селезенке погибшей птицы; в жидкой и клеточной фракциях культур ткани. Качественную оценку РГА проводили по степени агглютинации клеток крови от «+» до «++++».

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью пакета программ SPSS 12.0 для ОС Windows. Достоверность полученных отличий определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми различия считали при $P \leq 0,05$. Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения (\bar{X}) и стандартной ошибки среднего значения ($\pm SE$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В племенных птицеводствах для иммунизации взрослого маточного поголовья ветеринарные специалисты отдают предпочтение инактивированным вакцинам. Использование для их приготовления высоковирулентных вегетативных штаммов вируса болезни Ньюкасла не всегда оправданно с противозооэпидемиологической точки зрения из-за возможной остаточной вирулентности. С целью испытания более широкого спектра вакцинных штаммов возникла необходимость отработать оптимальные условия культивирования имевшегося в наличии мезогенного штамма ВБН, обеспечивающие максимальное его накопление в РКЭ, и дать оценку пригодности данного сырья для использования в указанном выше целевом направлении. Первоначально испытывали влияние на уровень накопления вируса заражающей дозы и объема инокулируемого в РКЭ вирусосодержащего материала. С этой целью лиофильно высушенный вирусосодержащий материал штамма ВБН с биологической активностью $8,78 \pm 0,15 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$

разводили физиологическим раствором хлористого натрия в степени от 10^{-1} до 10^{-8} .

Разведениями вируса 10^{-1} до 10^{-8} инфицировали 10-суточные развивающиеся куриные эмбрионы в аллантаисную полость в объеме 0,1 и 0,2 см³ (дозы от $6 \cdot 10^4$ до 0,6 ЭИД₅₀ на эмбрион и от $1,2 \cdot 10^5$ до 1,2 ЭИД₅₀ на эмбрион соответственно). На каждый вариант заражения использовали по 10 РКЭ. Инфицированные эмбрионы инкубировали

при испытанном для других штаммов режиме. Начиная с 24 ч после заражения эмбрионы овоскопировали через каждые 6 ч, а погибшие помещали на охлаждение при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ [8-10].

Уровень накопления вируса оценивали в количественной РГА по титрам его гемагглютининов в аллантаисную жидкость. Результаты исследований представлены в таблице.

Уровень накопления вируса болезни Ньюкасла в РКЭ
Degree of Newcastle virus accumulation in RKE

Объем вводимого материала, см ³	Титры гемагглютининов при разведениях вирусодержащего материала					
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
0,1	358±79	313±54	384±99	320±53	99±47	25±15
0,2	302±62	320±47	295±41	320±80	311±39	359±87

Данные таблицы свидетельствуют, что при объеме инокулируемого вирусодержащего материала 0,1 см³ накопление гемагглютининов штамма ВБН происходит на высоком уровне и существенно не различается ($P > 0,5$) при использовании для заражения РКЭ разведений вируса до 10^{-6} (доза в данном случае ~ 60 ЭИД₅₀). При заражении РКЭ меньшими дозами этого же объема материала уровень накопления гемагглютининов существенно снижается ($P < 0,01$). При испытании объема вводимого материала в количестве 0,2 см³ вне зависимости от заражающей дозы накопление гемагглютининов оказалось практически одинаковым ($P > 0,5$).

ВЫВОДЫ

1. При заражении развивающегося куриного эмбриона штаммом ВБН с биологической активностью не ниже $8,8 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ можно использовать любые разведения вируса при объеме вводимого материала 0,2 см³ и разведения до $1:10^6$ при объеме инокулята 0,1 см³.

2. При отработанных вариантах культивирования штамма ВБН возможно проведение наработки вирусодержащего сырья для отработки технологии приготовления инактивированного препарата против ВБН.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц* / под ред. Б. У. Келнека, Х. Дж. Барнса, Ч. У. Биэрда [и др.]. – 2003. – 1232 с.
2. Gough R. E., Allan W. H. Aerosol vaccination against Newcastle disease using the Ulster strain. // *Avian Path.* – 1976. – Vol. 5. – P. 81–95.
3. Lam K. M., Hao Q. Vaccination of cyclophosphamide-treated chickens against Newcastle disease virus interferon // *Vet. Microbiol.* – 1994. – Vol 45, N 1–2. – P. 41–48.
4. *Newcastle disease vaccine on scratch feeds* // *World poultry.* – 1989. – Vol. 53, N 8. – P. 12.
5. *Newcastle disease*. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees // Office Internationaldes Epizootics. – Paris, 2009. – Chapter 2.3.14. – P. 576–589.
6. Meulmanns G. Control by vaccination Newcastle disease. – Boston: Kluver, 1988. – P. 318–332.

7. *Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus* / P. J. Miller, L. M. Kim, H. S. Ip, C. L. Afonso // *Virology*. – 2009. – Vol. 391. – P. 64–72.
8. Михайлова В. В., Виткова О. Н., Белоусова Р. В. Изучение некоторых биологических свойств изолятов вируса ньюкаслской болезни, выделенных от голубей // Материалы 3-й конф. по учеб.-метод. и науч.-практ. работе академии. – М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2006. – С. 20–23.
9. Зубцова Р. А., Агеева Л. С. Изучение иммунобиологических свойств вирус вакцины против псевдоочумы птиц из штамма Ла-Сота // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы 3-й Всесоюз. вет.-вирусол. конф. – М., 1967. – Т. 1. – С. 221–222.
10. Хоргуани Г. Эффективность различных методов вакцинации птиц против ньюкаслской болезни // Ветеринария. – 1990. – № 6. – С. 32–34.

REFERENCES

1. Kelneka B. U., Barnsa D. H., Biehrda Ch. U. *Bolezni domashnih i sel'skohozyajstvennyh ptic* (Diseases of domestic and farm birds), 2003, 1232 p.
2. Gough. R.E., Allan W.H. Aerosol vaccination against Newcastle disease using the Ulster strain, *Avian Path.*, 1976, Vol.5, pp. 81–95.
3. Lam. K.M., Hao Q. Vaccination of cyclophosphamide-treated chickens against Newcastle disease virus interferon, *Vet. Microbiol.*, 1994, No. 1–2 (45), pp. 41–48.
4. Newcastle disease vaccine on scratch feeds, *World poultry*, 1989, No. 8 (53), 12 p.
5. Newcastle disease, OIE Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees, *Office Internationaldes Epizootics*, Paris, 2009, pp. 576–589, Chapter 2.3.14.
6. Meulmanns. G. *Control by vaccination Newcastle disease*, Boston: Kluver, 1988, pp. 318–332.
7. Miller. P.J., Kim. L.M., Ip. H.S., Afonso C. L. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus, *Virology*, 2009, Vol. 391, pp. 64–72.
8. Mihajlova V. V., Vitkova O. N., Belousova R. V. *Izuchenie nekotoryh biologicheskikh svojstv izolyatov virusa n'yukaslskoj bolezni, vydelennyh ot golubej* (Study of some biological properties of Newcastle disease virus isolates isolated from pigeons), Proceeding of the Scientific and Practical Conference, Moscow: FGOU VPO MGAVMiB, 2006, pp. 20–23. (In Russ.)
9. Zubcova R. A., Ageeva L. S. *Izuchenie immunobiologicheskikh svojstv virus vakciny protiv psevdochumy ptic iz shtamma La-Sota, Aktual'nye voprosy veterinarnoj virusologii* (Topical issues of veterinary virology), Proceeding of the National Conference, Moscow, 1967, Vol. 1, pp. 221–222. (In Russ.)
10. Iorguani G. «Эффективность» различных методов вакцинации птиц против н'юкаслской болезни, *Veterinariya*, 1990, No. 6, pp. 32–3.