

А. Б. ХАЧАТРЯН, А. А. ПОГОСЯН

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ, АТТЕНУИРОВАННОГО В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ

Исследованиями ряда отечественных и зарубежных авторов установлена возможность аттенуации вируса Ньюкаслской болезни птиц (псевдочумы) путем адаптации его к организму млекопитающих или выращивания в куриных эмбрионах и в культуре клеток разных животных [1, 2, 3, 4, 5].

Применяемые в практике вакцинные штаммы вируса псевдочумы птиц (В₁, Н, F, Ла-Сота) получены в зарубежных странах и в большинстве случаев представляют изменившиеся в естественных условиях слабовирулентные варианты его.

Наиболее иммуногенный из них, штамм Н, получен из эпизоотического вируса путем длительного пассирования на куриных зародышах.

Задачей наших исследований являлось получение из местного высоковирулентного вируса псевдочумы птиц иммуногенного штамма, аттенуированного путем пассирования на клетках культуры ткани.

Материал и методы. Работа проводилась с вирусом, выделенным нами в 1959 г. у больных псевдочумой кур колхоза села Ахамзалу АрмССР. Вирус обладал высокой вирулентностью ($\text{ЭЛД}_{50} = 10^{10}$) и вызывал массовую гибель их.

Для выращивания вируса применяли однослойные культуры первично трипсинизированных клеток: фибриобластов куриных эмбрионов (ФКЭ), почек эмбрионов свиней (ПЭС) и почек 3—5-дневных крольчат (ПК). Клеточные культуры выращивали в растворе Хенкса, содержащем 0,5% гидролизат лактальбумина, 10% сыворотки крупного рогатого скота (для ФКЭ—3%) и антибиотики.

Для серологической идентификации пассажного вируса применяли реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) и нейтрализации вируса на культуре ткани и в куриных эмбрионах. Иммунную сыворотку получали от кроликов, гипериммунизированных культуральным вирусом того же штамма.

Вирулентность культурального вируса разных пассажей проверяли на 9—10-дневных куриных эмбрионах и на 3—4-месячных цыплятах путем введения эмбрионам в дозе 0,1 мл и цыплятам в дозе 1 мл неразведенной культуральной жидкости каждого пассажа, содержащей 10^6 — 10^8 ТЦД₅₀ и ЭЛД₅₀ в 0,1 мл. Титр ЦПД₅₀ и ЭЛД₅₀числяли по формуле Риды и Менча.

Иммуногенность культурального вируса испытывали на 3—4-месячных цыплятах.

В качестве вирулентного вируса для контрольного заражения иммунизированных и контрольных цыплят во всех опытах использовали мозговую ткань павшей от псевдочумы курицы, эмульгированную в физиологическом растворе в разведении 1:500 и 1:1000, с титром ЭЛД₅₀ 10^{-8} в 0,1 мл.

Высушивание культурального вируса производили в камерном аппарате лиофильной сушки (Чехословацкого производства, марки «КС-6»). Защитной средой служило обезжиренное молоко, содержащее 10% сахарозы, которое смешивали с культуральной жидкостью 1:1.

Реверсibilitätность аттенуированного вируса проверяли путем пассирования вирус-содержащей культуральной жидкости через куриные эмбрионы и организм 3—4-месячных цыплят.

Результаты исследования. Исходный вирус псевдочумы птиц, штамм А, на культурах клеток ФКЭ, ПСЭ и ПК прошел соответственно 110, 107 и 125 пассажей.

Выраженное ЦПД вируса на культуре ФКЭ появилось в первом пассаже, через 24—36 часов после заражения клеток и сохранялось во всех последующих пассажах.

Титр ЦПД₅₀ вируса штамма А до 65-го пассажа как на ФКЭ, так и на ПСЭ колебался в пределах $10^{-6,5}$ — 10^{-8} . В дальнейших пассажах установился постоянный титр $10^{-6,5}$ — 10^{-7} .

Вирулентность вируса в отношении куриных эмбрионов сохраняется во всех пассажах независимо от культуры, на которой он выращивается.

Гемагглютинирующая активность вирусосодержащей культуральной жидкости выражена слабо, 1:32—1:4. Однако экстраэмбриональная жидкость куриных зародышей, зараженная культуральным вирусом, обладает высоким гемагглютинирующим титром—1:1280—1:10240.

Сыворотка кроликов, гипериммунизированных культуральным вирусом 27-го и 54-го пассажей на ПСЭ, вызывала задержку наступления гемагглютинации (РЗГА) в разведении 1:1024 и нейтрализовывала вирус 1000 ТЦД₅₀ на культуре ткани и 100 ЭЛД₅₀ в куриных эмбрионах в разведении 1:512 и 1:1024.

По мере увеличения количества пассажей вируса на культурах клеток ФКЭ и ПСЭ вирулентность его в отношении эмбрионов не изменяется, в то время как для цыплят она постепенно утрачивается. При выращивании вируса на ФКЭ ослабление вирулентности наступало к 60-му пассажу, из 6-ти кур, зараженных вирусом этого пассажа, пала только одна, а из 33-х зараженных вирусом 70-го, 80-го, 90-го, 100-го, 110-го пассажей ни одна не заболела и не пала. При выращивании на клетках ПСЭ полная потеря вирулентности наступала с 90-го пассажа. На культуре клеток ПК до 120-го пассажа снижение вирулентности вируса не отмечалось. Эти данные приведены в табл. 1.

Результаты проверки иммуногенности культурального вируса для цыплят 3—4-месячного возраста приведены в табл. 2.

Данные табл. 1 и 2 показывают полную авирулентность и высокую иммуногенность культурального вируса штамма А, выращенного на ФКЭ с 62-го до 105-го пассажа, и на клетках ПСЭ—с 90-го по 100-ый пассаж (проверенные числа).

Полученный аттенуированный вирус псевдочумы птиц штамма А сохраняет иммуногенность и после лиофильного высушивания. Вирус-содержащую культуральную жидкость 76-го и 77-го пассажей на ФКЭ

Таблица 1

Результаты проверки вирулентности культурального вируса штамма А
для цыплят и эмбрионов

№№ пассажей	Культура ткани					
	ФКЭ		ПСЭ		ПК	
	цыплята	эмбрионы	цыплята	эмбрионы	цыплята	эмбрионы
10	4/4	6/6	2/2	—	4/4	—
20	2/2	6/6	5/6	6/6	8/8	6/6
30	2/2	4/4	4/4	12/12	2/2	12/12
40	2/2	4/4	4/4	8/8	—	8/8
50	4/4	14/14	4/4	8/8	4/4	8/8
60	1/6	4/4	2/2	8/8	2/2	8/8
70	0/10	12/12	2/2	—	—	—
80	0/10	8/8	1/2	8/8	2/2	8/8
90	0/6	4/4	0/2	8/8	2/2	8/8
100	0/3	4/4	0/10	4/4	2/2	4/4
110	0/4	4/4	—	—	—	—
120	—	—	—	—	—	—

Знаменатель — число зараженных.

Числитель — число павших.

Таблица 2

Проверка иммуногенности культурального вируса

№№ пассажей	Вirus, выращенный на ФКЭ				Вirus, выращенный на клетках ПСЭ				
	количество привитых цыплят	контроль, зараже- ние через	Результаты		№№ пассажа	количество привитых цыплят	контроль, зараже- ние через	Результаты	
			пало	живы				пало	живы
62	7	20 дней	—	7	90	5	3 дня	—	5
75	7	20 дней	—	7	92	5	3 дня	—	5
77	7	20 дней	—	7	96	5	3 дня	—	5
78	7	20 дней	—	7	100	5	3 дня	—	5
80	7	30 дней	—	7	контроль	5	3 дня	5	—
85	7	20 дней	—	7					
96	8	30 дней	—	8					
105	8	20 дней	—	8					
Контроль	10		10						

проверяли на вирулентность и иммуногенность через 2,5 и 11 месяцев после сушки. На каждый срок брали по 6 голов 3—5-месячных цыплят (всего 36), которым внутримышечно вводили по 0,5 мл (10^5 ЭЛД₅₀ в 0 : 1 мл) высушенного вируса в разведении 1 : 1000. В течение 14-и дней привитые цыплята не проявили каких-либо признаков заболевания. По истечении этого срока всех 36 привитых цыплят вместе с 10-ю контрольными, непривитыми, заражали внутримышечно вирулентным вирусом псевдочумы. В течение 10-ти дней все контрольные цыплята пали с признаками псевдочумы, а 36 опытных, получивших культуральный высушенный вирус обеих пассажей, остались живы.

В целях проверки реверсibilityности аттенуированного вируса вирусосодержащую культуральную жидкость 77-го пассажа на ФКЭ перепассировывали через куриные эмбрионы 20 раз и через организм 3—4-месячных цыплят—10 раз. Каждый пассаж производили на 4—6-ти эмбрионах и 2-х цыплятах.

Экстраэмбриональную жидкость куриных зародышей 4, 8 и 20-го пассажей, неразведенную и разведенную в соотношении 1 : 100, по 0,5 мл вводили 30 цыплятам (6 групп по 5 голов в каждой).

В течение 10-ти дней подопытные цыплята не проявили признаков заболевания. По истечении этого срока все 30 цыплят, получивших экстраэмбриональную жидкость, и 10 цыплят, на которых пассажировали культуральный вирус (по одному с каждого пассажа), вместе с 10-ю контрольными заражали вирулентным вирусом в дозе 1 мл, содержащей 10^5 ЭЛД₅₀ в 0,1 мл. В результате все опытные цыплята остались живы, а контрольные пали.

Таким образом, в процессе 20-ти пассажей на куриных эмбрионах и 10 пассажей на цыплятах восстановление утраченной вирулентности вируса не имело место.

Специальными опытами мы определяли срок наступления иммунитета у привитых цыплят в зависимости от разведения культурального вируса (табл. 3).

Таблица 3

Срок наступления иммунитета у птиц, привитых культуральным вирусом

Количество привитых цыплят	Разведение вируса 77-го пассажа (титр ЭЛД ₅₀ 10^5 в 0,1 мл). Доза 1 мл	Падеж цыплят после контрольного заражения, произведенного после иммунизации культуральным вирусом через	
		72 часа	10 дней
10	Цельный	0/5	0/5
10	1:100	0/5	0/5
10	1:500	1/5	0/5
10	1:1000	1/5	0/5
	Контроль	5/5	5/5

Знаменатель — число зараженных.

Числитель — число павших.

Иммуногенные свойства аттенуированного культурального вируса были испытаны и в хозяйственном опыте.

На Чарбахской экспериментальной базе института под опыт было взято 1340 голов 80-дневных ранее невакцинированных цыплят. Одной группе (800 голов) вводили высушенный (через 5 месяцев после сушки) культуральный вирус 77-го пассажа в разведении 1 : 2000, другой (540 голов)—в разведении 1 : 1000 в дозе по 1 мл внутримышечно.

В течение 3-месячных наблюдений среди вакцинированных цыплят никаких отклонений от нормы не было отмечено. Спустя 2 и 3 месяца после иммунизации по 8 голов из каждой группы (всего 32 гол.) и 10 невакцинированных контрольных цыплят были доставлены в лабора-

торию и подвергнуты заражению вирулентным вирусом псевдочумы птиц. В результате все контрольные цыплята пали, тогда как из опытной группы пал лишь 1 цыпленок, получивший культуральный вирус в разведении 1 : 2000.

Армянский научно-исследовательский институт
животноводства и ветеринарии

Поступило 3.VII 1969 г.

Ա. Բ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Ա. Ա. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԱՅԻՆ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ ԱՏԵՆՈՒԱՑՎԱԾ ՆՅՈՒՆԿԱՍԻԻ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ԷՊԻԶՈՏԻԿ ՎԻՐՈՒՍԻ ԻՄՈՒՆՈՐԵՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Մեր հետազոտության նպատակն էր հյուսվածքային կուլտուրաների վրա բազմապատիկ պատվաստումների (պասաժների) միջոցով, տեղական բարձր վիրուլենտություն ունեցող թռչունների կեղծ ժանտախտի վիրուսից ստանալ նրա ատենուացրած, բարձր իմունոգենությամբ օժտված տարբերակը: Այդ նպատակով 1959 թվականին Ախամզգալուի կուլտուրաների հավերից, որոնք հիվանդ էին կեղծ ժանտախտով, անջատեցին վիրուսի մի շտամ՝ օժտված բարձր վիրուլենտությամբ, որը պայմանորեն անվանեցին շտամ Ա:

Այդ շտամն աճեցրել ենք հավի սաղմի ֆրեբրլաստների (ՀՄՖ), խոզի սաղմի (ԽՄՆ) և ճագարների (ՃՆ) երիկամների բջիջներից աճեցրած միաշերտ հյուսվածքային կուլտուրաների վրա:

Մեզ հաջողվել է ՀՄՖ և ԽՄՆ բջիջների կուլտուրաների վրա 60—120 հաջորդական պասաժներից հետո այդ վիրուսի ախտածնությունն աստիճանաբար թուլացնել և ստանալ նրա մի տարբերակը (շտամ), որը միանգամայն անվտանգ է հավերի ու ճտերի համար և միաժամանակ առաջացնում է նրանց մոտ իմունիտետ կեղծ ժանտախտի դեմ: Այդ երկու հյուսվածքային կուլտուրաների վրա թուլացրած (ատենուացրած) վիրուսով պատվաստված ճտերն ու հավերը 48—72 ժամից հետո ձեռք են բերում կայուն իմունիտետ կեղծ ժանտախտի բարձր վիրուլենտություն ունեցող վիրուսի դեմ և այդ իմունիտետը պատվաստված թռչունների մոտ պահպանվում է ոչ պակաս, քան 8 ամիս (ստուգված ժամկետ):

Հյուսվածքային կուլտուրաների վրա աճեցրած ատենուացրած Ա շտամի վիրուսը լիոֆիլ եղանակով չորացնելուց հետո 4—6° ջերմության պայմաններում պահելու դեպքում, պահպանում է իր իմունոգեն և այլ կենսաբանական հատկությունները 11 ամսվա ընթացքում (ստուգված ժամկետ):

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гаврилов В. И., Додонова Н. Н. Вopr. вирусол. 1, 1962.
2. Колосов В. М., Сюрин В. Н. Вopr. ветеринарной вирусол. I, 1964.
3. Сюрин В. Н. Диссертация ГНКИ МСХ СССР, М., 1956.
4. Хачатрян А. Б. Акт. вopr. ветеринарной вирусол., I, 1965.
5. Bancowski R. A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96, 1957.