

Культивирование вируса оспы кур

к.б.н. И.П.Николаева, А.И.Седунова, О.Н.Талыбова НПП АВИБАК

Оспа птиц регистрируется во многих странах мира, в том числе и в России. Вспышки ее причиняют большой экономический ущерб птицеводческим хозяйствам. В естественных условиях оспа установлена у кур, голубей, индеек, чаек, воробьев и прочих диких птиц (более 60 видов).

Источником инфекции являются больные и переболевшие птицы, содержащие вирус, корма, вода, инвентарь, подстилка, одежда обслуживающего персонала.

Во внешнюю среду вирус оспы попадает с отпадающим детритом кожного эпителия, в котором может сохраняться до 18 лет, а также со слизистыми выделениями из ротовой и носовой полостей, глаз и с помётом. Переносчиками вируса являются сельскохозяйственные и дикие птицы, грызуны и кровососущие насекомые.

Развитию инфекции предрасполагают: нарушение технологии содержания птиц, травмы кожи, расклёвы, повышенная плотность посадки, антисанитария. У кур различают кожную, дифтероидную, смешанную и атипичную формы болезни. Экономические потери хозяйства при заболевании оспой складываются из смертности при кожной форме 5-8%, при дифтеритической и смешанной форме до 50-70% задержки начала яйцекладки и снижении яйценоскости до 40-50%, основным средством борьбы является специфическая профилактика болезни.

Вакцины готовят из иммуногенных, ареактивных штаммов гетерологического вируса оспы голубей (шт. Н), из природоослабленных штаммов вируса оспы или аттенуированных на культуре клеток вирусов оспы кур (шт. К) в основном культивируемых в культуре клеток куриных эмбрионов.

Основными показателями, характеризующими и влияющими на стабильность вакцин, являются исходные вакцинные штаммы вируса, системы в которых шт. культивируются, режим лиофилизации и состав защитных сред, которые обеспечили бы надежную защиту иммунобиологических свойств вирусов длительное время.

В задачу наших исследований входило подобрать систему культивирования вируса, в которой показатели биологической активности вируса были бы максимальными, а защитная среда обеспечила низкий процент потери инфекционной активности и остаточной влаги в лиофилизированном продукте и увеличила сроки хранения вакцины.

Материалы и методы

Работу проводили со штаммом «К» вируса оспы кур. Культуру клеток (КК) кожи эмбрионов кур (КЭК) и куриных эмбриональных фибробластов (КЭФ) готовили из СПФ куриных эмбрионов 10-дневного возраста общепринятым методом.

В качестве ростовой и поддерживающей среды использовали среды «ИГ ЛА» и «199». В процессе культивирования клеток КЭК изучали влияние разных посевных концентраций клеток на формирование монослоя, процентной концентрации сыворотки в ростовой среде. Культуру клеток

КЭК и КЭФ заражали разными дозами вируса оспы (1,98; 2,7; 11,87 ТЦД₅₀/мл).

Вирус титровали в культуре клеток КЭК и на 70-дневных цыплятах. Титр высчитывали по методу Рида и Менча. Вирус вводили в перепонку крыла, в объеме 0,015 мл, двухигольным инъектором методом укола. Опытные партии вакцины готовили в пятилитровых роллерных бутылках. В качестве защитной среды при лиофилизации использовали стабилизатор «Премьер» (декстрановый).

Результаты исследований.

В результате проведенных исследований нами установлено, что посевная концентрация клеток как для КЭК, так и для КЭФ, равная 1,5-2,0 млн./мл для роллерных бутылей, является оптимальной. Монослой формировался через 20-24 часа культивирования. Но монослой КЭК выглядел более светлым, ровным нежным. При одинаковом процентном содержании сыворотки в ростовой среде монослой из клеток КЭК формировался быстрее и выглядел лучше. Однако ее увеличение свыше 10% в составе ростовой среды способствовало формированию более плотного монослоя, быстрому смещению рН в кислую сторону за счет интенсивного метаболизма клеток, что в свою очередь приводило к более быстрому старению и сползанию монослоя.

Монослой КЭК и КЭФ заражали вирусом оспы одинаковыми дозами (1,98-2,70 ТЦД₅₀/мл). Результаты изучения влияния заражающей дозы вируса на сроки наступления цитопатического эффекта (ЦПЭ) и его интенсивность показали, что при заражающих дозах вирусом оспы 1,98-2,70 ТЦД₅₀/мл максимальный эффект наступает на 6-7 день, а при увеличении дозы до 11,85 ТЦД₅₀/мл - на 3-4 день. Инфекционный титр вируса в культуральной жидкости после заражения монослоя дозами 1,98 и 2,70 ТДЦ₅₀/мл составляет для КЭК-7,5 lg ТЦД₅₀/мл, а для КЭФ-6,72 lg ТЦД₅₀/мл. После же заражения монослоя дозой 11,85 ТЦД₅₀/мл титр вируса был равен на КЭК-6,6 lg ТЦД₅₀/мл. Цитопатическое действие вируса характеризовалось выраженным округлением клеток, которые сохранялись 2-3 дня, затем наступал лизис.

Полученные результаты показали, что более чувствительной к заражению вирусом оспы является КЭК, чем культура КЭФ. Титр вируса, полученный на КЭК был на 1,0-1,5 lg ТЦД₅₀/мл выше, чем в КЭК, сроки ЦПЭ зависели от заражающей дозы вируса. Добавление в поддерживающую среду даже 2% сыворотки КРС оказывало отрицательное действие на накопление вируса оспы кур.

Исследования влияния температуры культивирования на репродукцию и накопление вируса показали, что в диапазоне температур 34-37⁰С вирус накапливался в одинаковых титрах. При 29⁰С репродукция вируса затягивалась до 12 суток, против 5-6 дней при 34-37⁰С, и вирус накапливался в меньших титрах.

Биологическую активность вируса испытывали на 70-дневных цыплятах методом прокола перепонки крыла двухигольным инъектором. Образцами для титрации вируса оспы на птице служила вирусосодержащая жидкость, полученная на КЭК с титром 7,5lg ТЦД₅₀/мл. Титр вируса на птице составлял 3,5lg ИД 50/0,015мл. Результаты титрования оценивали по образованию на месте прокола типичных оспин на 7-8 день после инъекций. Оспины исчезали на 21-ый день не вызывая побочных реакций.

Не маловажным фактором при производстве вакцины является стабилизирующая среда и режим лиофилизации. В последнее время для лиофилизации культуральных вакцин используют стабилизатор на основе декстрана. Нами были проведены сравнительные исследования, в которых при лиофилизации вируса оспы использовали сахарозо-желатиновый и декстрановый стабилизаторы при прочих равных условиях.

Анализ полученных данных показал, что потери инфекционной активности при использовании декстранового стабилизатора составляли 0,4-0,5 lg, а с сахарозожелатиновым 0,7-0,9 lg.

Еще одним преимуществом декстранового стабилизатора является сохранность активности вакцины до 1,5 лет (срок наблюдения).

Вакцинация цыплят 70-дневного возраста вакциной, хранившейся 1,5 года, показала, что титр остался таким же, как и был после лиофильной сушки (3,5 lg ИД₅₀/0,015 мл). Таким образом, на основании проведенных исследований можно констатировать, что наиболее чувствительной к вирусу оспы является культура клеток кожи куриных эмбрионов. Добавление сыворотки в поддерживающую среду отрицательно влияет на репродукцию и накопление вируса оспы кур.

Использование в качестве стабилизирующей среды на основе декстрана при лиофилизации вируса оспы минимально снижает инфекционную активность вируса и увеличивает сроки его хранения.

Литература

1. Сюрин В.Н. Частная ветеринарная вирусология М., Издательство «Колос» 1979 г.
2. Черкезова Т.В., Чистова З.Я. Профилактические эффективные средства защиты животных и методы контроля качества биологических препаратов.

ВГНКИ вет. препаратов. Сборник научных трудов, т.№53 г. Москва 1991г.

3. Сборник работ молодых ученых, выпуск X, г. Москва, 1968г.
4. Гуненков В.И. Сюрин В.Н.Спектр чувствительности культур тканей и хореаллантаоиса куриных эмбрионов к различным вирусам оспы.

Вопросы ветеринарной вирусологии . Том 2, Москва, 1966