

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

КЮБРА ЮСИФ КЫЗЫ ЮСИФОВА

**ИЗУЧЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ОСПЫ ПТИЦ**

**3109.01 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микотоксикология
с микологией и иммунология**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

Диссертация на соискание ученой степени
доктора философии по биологии

БАКУ – 2016

Диссертационная работа выполнена в Азербайджанском Ветеринарном Научно-Исследовательском Институте, в отделе контроля качества биологических препаратов.

Научный руководитель:

К.б.н., доц.

Т.А.Алиева

Официальные оппоненты:

Д.вет.н., проф.

К.вет.н.

Э.Н Агаева

Г.Г.Дильбази

Ведущая организация: **Азербайджанский Государственный Аграрный Университет, кафедра эпизоотологии, микробиологии и паразитологии.**

Защита диссертации состоится 28 октября 2016 года в 14:00 часов на заседании Диссертационного Совета FD. 01.222 при Институте Микробиологии НАН Азербайджанской Республики по адресу: AZ 1004, г.Баку, ул.М.Мушфиг 103.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Микробиологии НАН Азербайджанской Республики

Автореферат разослан «__» сентября 2016 г.

**Ученый секретарь Диссертационного
Совета FD 01.222,**

д.н.п.б., доцент

Ф.Х.Гахраманова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Оспа птиц - вирусное заболевание птиц, характеризуется кожными или дифтерийными поражениями слизистой ротовой полости и дыхательных путей. Она относится к известным и наиболее изученным болезням, но все ещё представляет серьёзную проблему для птицеводства. Оспа птиц регистрируется во многих странах мира и ежегодные убытки, наносимые оспой, оцениваются миллионами, складывающимися из смертности птицы, выбраковки больной птицы, снижения выводимости, яйценоскости и мясной продуктивности. В Азербайджане, на сегодняшний день развитие птицеводческой промышленности с целью обеспечение населения качественным мясом птицы и яйцами является одним из главных приоритетов экономической политики страны. Вследствие этого, борьба с болезнями птиц, в том числе с оспой, является одной из актуальных задач птицеводства, а в частности, получение биологически активных препаратов для специфической профилактики заболевания, является важным аспектом успешного развития птицефабрик нашей страны.

В 1985 -1988 годах прошла апробацию эмбриональная высокоиммуногенная, ареактогенная вакцина против оспы кур из аттенуированного штамма «Баку», разработанная в Азербайджанском НИВИ Ф.Б.Шириновым и А.Н. Годжаевым. Техника изготовления эмбриональных вакцин несколько трудоёмкая и существует возможность её контаминирования микроорганизмами, вирусами и грибами. В связи с этим использование клеточных систем в производстве вакцин против оспы птиц оправдывается во многих отношениях. Впервые культурная вакцина, против оспы птиц, изготовленная из штамма «К» и предназначенная для иммунизации кур и других птиц, была внедрена в практику в 1989 году. Этой вакциной иммунизация птиц проводится в возрасте от 25 дней и старше. Однако, на основании полученных эпизоотических данных было выявлено, что в регионах с жарким климатом, цыплята болеют оспой с более раннего возраста, к которым относится и Азербайджан. В следствии этого, применение и этой вакцины стало нерентабельно в наших условиях, а возможное использование местного штамма, характерного для наших условий, улучшило бы ситуацию профилактики птиц против оспы.

Цель и задачи исследований: В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилось изучить возможность культивирования, вируса оспы птиц на первично-трипсинизированных клеточных культурах эмбрионов японских перепелов (ЭЯП) и фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК), для получения модельной системы культурального, высокоиммуногенного антигена, необходимого в изготовлении биологических препаратов профилактики оспы птиц. В соответствии с этим в задачи исследования входило:

- Определение чувствительности культуры клеток эмбрионов японских перепелов (ЭЯП) и фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК) к вирусу оспы птиц штамм «Баку» и адаптация вируса к культуре клеток
- Определить оптимальные условия культивирования вируса оспы птиц в первично-трипсинизированных культурах клеток из тканей куриных и перепелиных эмбрионов.
- Выявить возможность применения метода бляшкообразования для индикации и титрования вируса оспы в клеточных системах.
- Определение интерферирующей активности между вирусом бешенства (шт. “КП-85”) и вирусом оспы птиц (шт. “Баку”).
- Изучить антигенную активность культурального вируса оспы птиц для цыплят.
- Оценка антигенной активности вируса оспы птиц штамм «Баку» в сравнении со штаммом «К» в опытах на двухмесячных цыплятах.

Научная новизна. Впервые установлена чувствительность первично-трипсинизированных культур клеток ЭЯП и ФЭК к вирусу оспы птиц штамм "Баку", выявлено высокое накопление вируса в данных клеточных системах по мере его пассирования. Установлены оптимальные условия культивирования вируса оспы птиц в культуре клеток ЭЯП: время адсорбции, температурный режим, рН среды, концентрация сыворотки в поддерживающей среде, заражающая доза вируса. Впервые изучены методы индикации и титрования вируса оспы птиц штамм «Баку» в клеточных системах методом интерференции и бляшкообразования. Впервые в сравнительном аспекте с эмбриональным штаммом «Баку» изучена антигенная активность культурального вируса оспы птиц. Доказана возможность получения культурального, высокоиммуногенного варианта штамма «Баку» вируса оспы птиц.

Практическая значимость работы. Первично - трипсинизированная клеточная линия ЭЯП может быть предложена как модель для культивирования, индикации, аттенуации, получения максимальной биомассы вируса оспы птиц для дальнейшего его использования в биологической промышленности при изготовлении вакцинных препаратов.

Апробация результатов исследований: Основные результаты работы доложены: На международной научной конференции "Роль молодых ученых в сельском хозяйстве: проблемы и возможности», г. Баку, 18 июнь 2014 г.;

На II международной научной конференции «Совет молодых ученых центра аграрной науки» и «Сотрудничество Азербайджана и Турции в области научных исследований развития пчеловодства». 9-11 iyun, Bakı, 2015.

На международной научно-практической конференции «Инновационное развитие сельскохозяйственной науки и образования, мирового опыта и современных приоритетов», 23-24 oktyabr, Azərbaycan Gəncləri, 2015.

Публикации. По теме диссертационной работы было опубликовано 10 научно-исследовательских статей.

Структура и объем диссертации: Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, описания результатов исследования, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Иллюстративный материал включает 16 таблиц, 20 рисунков и диаграмм. Список использованной литературы содержит 248 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Исследования проводились в лаборатории вирусных препаратов (2011-2015) Азербайджанского Государственного Научно-Контрольного Института Ветеринарных Препаратов (АзГНКИВП), затем в отделе контроля биологических препаратов Азербайджанского Ветеринарного Научно- Исследовательского Института (АзВНИИ) (2015-2016).

В работе использовали эмбриональный, высокоиммуногенный вирус оспы индеек из штамма «Баку», разработанный в Азербайджанском НИВИ Ф.Б. Шириновым и А.Н. Годжаевым в 1989 году, а так же первично-трипсинизированные культуры клеток эмбрионов японских перепелов (ЭЯП) и фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК).

Клеточные культуры выращивали в коммерческих питательных средах «199» и «ИГЛА МЕМ» производства ООО «НИП» «Ветеринарная медицина» 61072, Украина, г. Харьков ул.Тобольская 42, с добавлением глутамина. В ростовые питательные среды добавляли от 5 до 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) того же производства.

В качестве диспергирующего раствора применяли 0,25%-ный раствор трипсина, производства ООО «НИП» «Ветеринарная медицина» 61072, Украина, г. Харьков, ул. Тобольская 42, для промывания культур клеток применяли солевой раствор «Хенкса», производства ГУП ИПВЭ им.М.П.Чумакова РАМН 142782, Московская обл., Ленинский р-н, пос. Институт Полиомиелита.

Серийные пассажи вируса оспы птиц в клеточных системах проводили путем последовательных пассажей. Культуры клеток, зараженные вирусом оспы птиц, инкубировали до появления выраженного цитопатического эффекта вируса. Титр вируса определяли по методу Рида и Менча.

Для определения активности культурального вируса штамма «Баку» в культуре клеток применяли методы РГА, РТГА, титр вируса выражали $ГАЕ_{50/мл}$, \log_2 . Определение активности вируса осуществляли на ХАО куриных эмбрионов, титр вируса выражали в $ООЕ_{50}$, и на культуре клеток, титр вируса выражали в $ЦПД_{50/см}^3$.

Впервые для титрации вируса был применен метод интерференции, с применением интерферирующего вируса бешенства штамм «КП-85». Биологическую активность вируса испытывали на 70-дневных цыплятах. Результаты титрования оценивали по образованию на месте прокола перепонки крыла типичных оспин, титр вируса выражали в $ИД_{50/мл}$. Индикацию и титрацию вируса оспы птиц осуществляли в культуре клеток методом «бляшек» с агаровым покрытием («Difco») с добавлением индикатора нейтрального

красного. Титр вируса, выражали числом бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 см^3 .

СНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Адаптация вируса оспы птиц штамм «Баку» к культуре клеток

Задачей нашего исследования являлись подбор и использование высокочувствительных клеточных систем для адаптации и культивирования вируса оспы птиц штамм «Баку» с целью создания перспективной культуральной системы для его выращивания. Исследования были проведены на первично-трипсинизированных культурах ЭЯП и ФЭК. Для заражения культуры клеток использовали эмбриональный вирус оспы кур штамм «Баку».

Результаты исследований показали, что вирус оспы птиц штамм «Баку» при пассировании в культурах клеток обладал цитопатогенным эффектом и активно размножался в обеих клеточных системах. В культуре клеток ФЭК и ЭЯП возбудитель вызывал морфологические изменения, характеризующиеся увеличением размеров клеток, их округлением, появлением зернистости в цитоплазме - на 3- 4 сутки после заражения. На 4 сутки после заражения культуры клеток ФЭК вирусом оспы, отмечалась дегенерация клеток 25-50% монослоя. На 5-6 сутки в культуре ФЭК, на 7-8 сутки в культуре ЭЯП наблюдали полную деструкцию клеточного слоя.

Характер цитопатогенных изменений в обеих клеточных системах на протяжении 25 последовательных пассажей был одинаковым (Рис.1) При пассировании вируса оспы птиц в культуре клеток ФЭК первые цитопатические изменения мы наблюдали на 4-5 пассажах, в то время как в культуре клеток ЭЯП в первых пассажах вирус не вызывал цитопатогенных изменений. Первые признаки ЦПД вируса в культуре ЭЯП мы наблюдали на 9-10 пассажах. Активность вируса оспы в культуре клеток ФЭК на начальных этапах его культивирования была в пределах от $1:64 \text{ ГАЕ}_{50/\text{мл}}$ до $1:256 \text{ ГАЕ}_{50/\text{мл}}$, а в культуре клеток - ЭЯП - в пределах от $1:64 \text{ ГАЕ}_{50/\text{мл}}$ до $1:128 \text{ ГАЕ}_{50/\text{мл}}$.

В культуре клеток ЭЯП активность вируса, начиная с 11 пассажа, постепенно повышалась, с 20 пассажа - оставалась стабильной на уровне $1:512 \text{ ГАЕ}_{50/\text{мл}}$.

Высокий титр вируса оспы птиц 1: 512 ГАЕ держался на протяжении 3 суток, а в культуре ФЭК - 2 суток. Определение активности вируса на куриных эмбрионах показало, что титр вируса

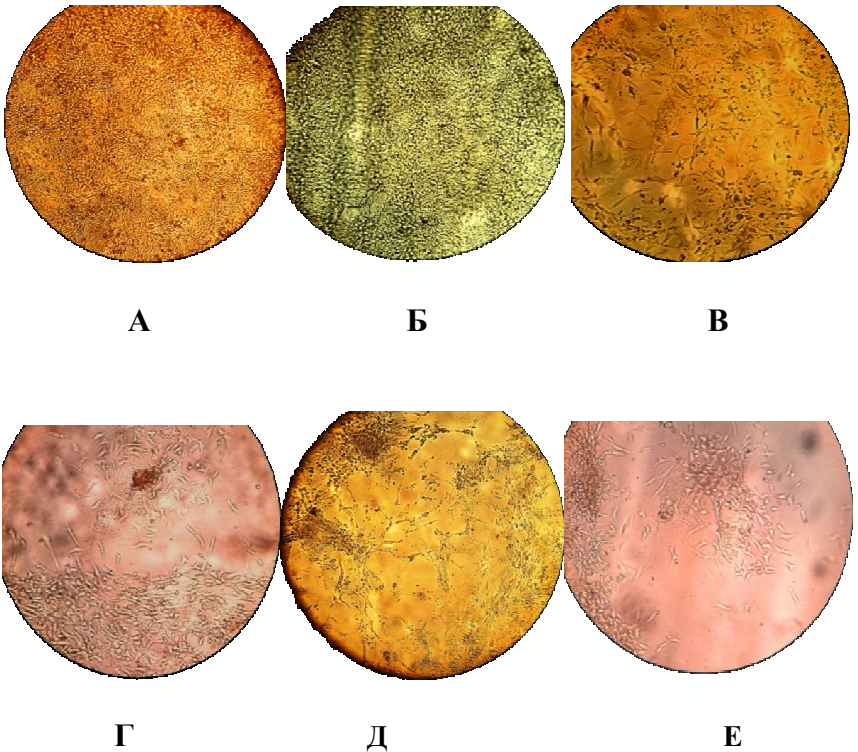


Рис. 1 Цитопатогенное действие вируса оспы птиц штамм «Баку» в культуре клеток эмбрионов японских перепелов и фибробластов куриных эмбрионов. А, Б – контроль – не зараженный вирусом оспы птиц монослой культуры ЭЯП и ФЭК, на 6 – 7 сутки инкубирования. В, Г– ЦПД вируса оспы птиц штамм «Баку» в культуре ЭЯП и ФЭК на 4-5 день, Д, Е – ЦПД вируса оспы птиц штамм «Баку» в культуре ЭЯП и ФЭК на 6-7 день.



Рис. 2 Влияние пассирования на активность вируса оспы птиц.

----- активность вируса оспы птиц в культуре клеток ФЭК
 ————— активность вируса оспы птиц в культуре клеток ЭЯП

адаптированного к культуре клеток ФЭК, составлял $4,2 \lg \text{ЭИД}_{50}$, ЭЯП - $3,8 \lg \text{ЭИД}_{50}$.

Результаты опытов на цыплятах показали, что вирус оспы птиц штамм «Баку» адаптированный к культуре клеток ЭЯП и ФЭК, на 4-5 сутки после заражения вызвал у цыплят характерный фолликулит. На 6-е сутки оспенный фолликулит достигал максимального развития до «++++» крестов. Описанный фолликулит у птиц держался в течении шести-семи дней, после чего наступал этап постепенного угасания оспин. Проведенные нами исследования показали, что клеточная культура ЭЯП проявила достаточно высокую чувствительность к штамму "Баку". Это подтверждается накоплением вируса в этой системе в титре 7 - 8 \log_2 .

По литературным данным известно, что культура клеток ФЭК большей частью бывает контаминированной различными агентами, а в частности бактериальной, вирусной и микоплазменной инфекциями, что усложняет работу в производстве биопрепаратов для специфической профилактики оспы птиц. Поэтому клеточная система ЭЯП более эффективна для размножения вируса оспы птиц, как в практическом, так и в экономическом отношении. Таким образом, в наших исследованиях было выяснено, что культура клеток ЭЯП в сравнении с культурой клеток ФЭК является наиболее чувствительной и перспективной системой для культивирования вируса оспы птиц штамм «Баку», с целью получения больших биомасс биопрепаратов против оспы.

2. Оптимальные условия размножения вируса оспы птиц в клеточных системах

Влияние времени адсорбции на размножение вируса. Нами было проведено 25 последовательных пассажей вируса оспы птиц штамм «Баку» в клеточных системах ЭЯП и ФЭК. В опыте использован культуральный штамм «Баку» вируса оспы птиц, 10-тый пассаж с титром 3,2 Ig ТЦД. В качестве культуральной среды использовалась среда «Игла - МЕМ» с добавлением глутамина и 5 %-ной сыворотки крупного рогатого скота. Время адсорбции вируса составляло 10, 20, 40, 90 минут. Сбор проб для определения инфекционной активности вируса осуществляли каждые 24 часа.

Было выяснено, что активность вируса в культуре клеток ФЭК при времени адсорбции от 10 до 20 минут, на 5-6 сутки инкубации и составляла 64ГАЕ/_{0,5мл}, цитопатогенные изменения, вызванные вирусом оспы, составляли 40-50 % клеточного слоя. В культуре клеток ЭЯП цитопатогенные изменения, при времени адсорбции 10-20 минут, наблюдали на более поздних сроках - 6-7 сутки инкубации вируса, где титр его составлял 32-64 ГАЕ/_{0,5мл}. Время адсорбции 45-60 минут – для обеих клеточных систем является оптимальным, при этих условиях было возможным получить высокие титры вируса. При времени адсорбции в 90 минут получали высокий титр вируса оспы, но активность его характеризовалась коротким периодом, что связано с ускоренной дегенерацией клеточного пласта и полным его разряжением.

В результате исследований было выяснено, что оптимальное время адсорбции вируса на культуре клеток ЭЯП и ФЭК составило 45-60 минут, при данных условиях активность вируса составляла 256 - 512 ГАЕ/_{0,5мл}.

Влияния температурного режима на активность вируса оспы птиц в клеточных системах. Зараженный вирусом монослой инкубировали при температуре +4°C, 22°C и 36°C, 37°C, 39°C (± 2°C). В проведенных исследованиях было выяснено, что при культивировании вируса оспы птиц при температуре +4°C не наблюдалось повышения активности вируса. При температуре культивирования +22 °C активность вируса не превышала 6 log₂ в

течение 5 суток. Высокую активность вируса оспы птиц в клеточных системах ЭЯП и ФЭК наблюдали при температурном режиме от 36 °С до 37 °С. В этом режиме культивирования активность вируса достигала максимального значения от 7 log₂ до 8 log₂. В результате исследований было установлено, что оптимальной температурой для размножения вируса оспы птиц штамм «Баку» в клеточных системах ЭЯП и ФЭК является температура 36°С -37°С ±2°С.

Влияние концентрации сыворотки в поддерживающей среде на размножение вируса. Исходную культуру клеток выращивали на среде «ИГЛА МЕМ» с добавлением глутамина, содержание сыворотки крупного рогатого скота составляло 10%. После заражения вирусом клеточные системы вирус культивировали в поддерживающих средах с процентным содержанием от 1% до 10% содержанием сыворотки в поддерживающей среде и в безсывороточных средах. В результате исследований было выяснено, что при 3 % содержании сыворотки крупного рогатого скота, активность вируса в РГА составляла не более 5 log₂. При содержании сыворотки в поддерживающей среде от 1 - 2% вирус оспы птиц не размножался в клеточных системах, происходило только переживание вируса в течении 2-3 суток, как и в безсывороточной среде. 5%-ное содержание сыворотки крупного рогатого скота в поддерживающей среде положительно отражалось на накоплении вируса оспы, где на 5 сутки культивирования титр вируса достигал 8 log₂. Активность вируса была высокой на протяжении 3 суток. Увеличение же содержания сыворотки до 10 % приводило к ускоренному старению клеток, что отрицательно влияло на накопление вируса в клеточных системах.

Нами в сравнении было изучено влияние различных питательных сред на размножение вируса оспы птиц. Были испытаны среды «199» и «Игла-МЕМ» с добавлением глутамина и 5% сыворотки. Было выяснено, что максимальное накопление вируса (7 log₂) в культуре клеток ЭЯП и ФЭК происходит на 5-7 сутки после их заражения при использовании среды «Игла-МЕМ», а при использовании среды «199» титр составлял 6 log₂. Было выяснено, что в качестве поддерживающей среды для культивирования вируса оспы птиц штамм «Баку» в культуре клеток ЭЯП и ФЭК наиболее пригодной явилась среда «Игла -МЕМ» с 5 % сывороткой крупного рогатого скота.

Влияние рН среды на активность вируса оспы птиц в культуре клеток.

Определение кислотно-щелочного баланса осуществляли с помощью тест – полосок. Полученные данные показали, что оптимальным кислотным балансом для роста вируса оспы птиц оказались питательные среды с рН 7,2 - 7,4. Сдвиг баланса в ту или другую сторону неблагоприятно влияло на накопление вируса. Составной частью проведенных исследований явилось изучение характера накопления вируса оспы птиц штамм «Баку» в поддерживающих средах. Оказалось, что вирус оспы птиц, адаптированный к клеточным системам ЭЯП и ФЭК при пониженном рН (цвет среды желтый), не размножался, что подтверждалось его низким титром (2ГАЕ_{50}) или его отсутствием. При высоком содержании рН в питательной среде (цвет среды красный) результаты были аналогичные, активность вируса была низкой. Нами было установлено, что при рН поддерживающей среды, равной 7,2 - 7,4 (цвет среды оранжевый) вирус хорошо размножался в клеточных системах.

Влияние дозы заражения на репродукцию вируса. Первичные культуры клеток ЭЯП и ФЭК заражали вирусом оспы птиц в дозе - от 10^{-1} до 10^{-4} ТЦД_{50/мл}. Нами была определена зависимость титра вируса от дозы заражения. При заражении культуры клеток вирусом в дозе 10^{-3} ТЦД_{50/мл} наблюдалось максимальное накопление вируса в культуральной жидкости, на 3-тьи сутки культивирования ($6 \log_2$). При дозе заражения 10^{-4} ТЦД_{50/мл} активность вируса составляла $5 \log_2$, а при 10^{-2} ТЦД_{50/мл} - $4 \log_2$

В результате исследований было установлено, что наиболее высокое накопление вируса наблюдается в клеточных культурах на 5-ые сутки инкубирования при заражении в дозе 10^{-3} - 10^{-4} ТЦД_{50/мл}, где титр достигал своего максимального значения $7 \log_2$ - $8 \log_2$.

Динамика размножения вируса оспы птиц штамм «Баку» в клеточных системах. Для получения представления о фазах роста размножения вируса оспы птиц штамм «Баку» в культуре клеток ЭЯП и ФЭК исследования проводили в среде «Игла-МЕМ» с 5 % сывороткой крупного рогатого скота. Исходная заражающая доза составляла 10^4 ТЦД_{50/см³. О динамике размножения вируса оспы птиц судили по ЦПД в культуре ЭЯП и ФЭК. Монослой культуры заражали десятикратными разведениями культурального вируса оспы птиц двадцатого пассажа.}

Каждое взятое разведение соответствовало определенной дозе вируса оспы птиц. Через 3, 5, 7, 9 суток после инфицирования культуры клеток брали пробы для определения активности вируса. Было установлено, что для размножения вируса оспы птиц штамм «Баку» характерны присущие вирусам фазы: исходная фаза – фаза экспоненциального роста, вторая фаза - стационарная и последняя – фаза снижения активности вируса. В результате проведенных исследований было определено, что экспоненциальная фаза роста в клеточной системе ЭЯП и ФЭК длилась 4 суток, активность вируса на данной стадии размножения составляла $6 \log_2 - 7 \log_2$. Стационарная фаза размножения вируса оспы в клеточных системах ЭЯП и ФЭК составляла 48 -72 часа, титр вируса - $7 \log_2$. Стадия логарифмического спада (снижения активности вируса) наступала на 6-ые сутки инкубирования вируса оспы птиц в культуре клеток ФЭК, а в клеточной системе ЭЯП на сутки позже. Важно отметить, что на начальных этапах пассирования вируса оспы птиц в клеточных системах (5-9 пассажи) длительность стационарной фазы составляла 48 часов, а при дальнейшем его пассировании (от 11 до 25 пассажа) стационарная фаза в культуре клеток ЭЯП составляла 72 часов, активность вируса $6 - 7 \log_2$ (рис.3). Было выяснено, что при длительном пассировании вируса в клеточных системах наблюдается увеличение продолжительности стационарной фазы с высокими титрами активности вируса оспы птиц.

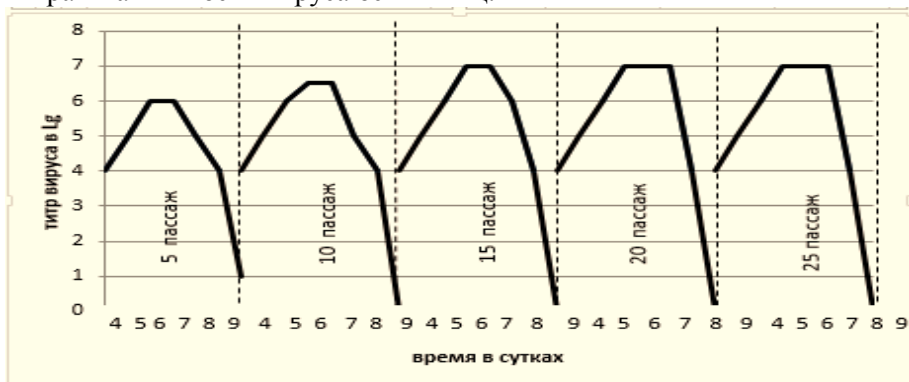


Рис. 3 Динамика размножения штамма «Баку» вируса оспы птиц в пассажах в культуре клеток ЭЯП

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что штамм «Баку» вируса оспы птиц легко адаптировался к культуре клеток ЭЯП, его можно длительно культивировать в этой клеточной системе с укороченными сроками культивирования без снижения титра его биологической активности, что имеет большое значение при разработке средств специфической профилактики против оспы птиц.

3. Индикация вируса оспы птиц штамм «Баку» методом «бляшек»

В исследованиях была изучена возможность образования бляшек в культуре клеток ЭЯП и ФЭК вирусом оспы птиц. Культуру клеток ЭЯП без признаков дегенерации заражали вирусом оспы птиц шт. «Баку» в разведениях от 10^{-1} до 10^{-4} ТЦД_{50/мл}. Далее обеспечивали контакт вируса с клетками с периодическим покачиванием, время адсорбции 1,5 часа при температуре 36°C - 37°C. Не адсорбированный вирус удаляли, затем на слой клеточной культуры наносили специальное агаровое покрытие с добавлением индикатора нейтрального красного (фон - розовый). После застывания агара флаконы с зараженной культурой в течении 7 суток инкубировали клетками вверх при 37°C. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча, выражали числом БОЕ в 1 мл (бляшкообразующие единицы). В результате исследований было выяснено, что на 5-6-тые сутки инкубации вируса оспы птиц в сплошном монослое живых клеток на агаровом покрытии появлялись бляшки различной формы (рис. 4). Образовавшиеся бляшки были в виде светлых участков, различных размеров на красном фоне клеток. Активность вируса составляла 1321 БОЕ/мл. Результаты опытов показали, что внесение прописи компонентов агарового покрытия обеспечивает обнаружение разрушенных вирусом клеток и получение бляшек, образованные под влиянием вируса оспы птиц. Соответственно, метод бляшек можно использовать для индикации вируса оспы птиц штамм «Баку» в культуре ЭЯП и ФЭК.

4. Определение интерферирующей активности между вирусом бешенства (шт. «КП-85») и вирусом оспы птиц (шт. «Баку»).

Проведены исследования по изучению интерферирующей активности фиксированного вируса бешенства (шт. КП-85), адаптированного к культуре клеток ЭЯП с цитопатогенным вирусом оспа птиц (шт. «Баку»). В качестве индикаторного агента использован вирус оспы птиц с титром $10^{4.48}$ БОЕ в 0,1 мл. Культуры клеток были заражены постоянной дозой «КП-85» 10^3 ЛД₅₀ культурального вируса и через 48 часа был внесен вирус оспы в дозе от 10^{-1} до 10^{-4} БОЕ в 0,1 мл. Учет результатов проводили через 48 часов после добавления индикаторного вируса оспы птиц по цитопатогенному действию и по методу «бляшек». Опыты показали, что интерферирующая активность штамма «КП-85» с культуральным вирусом оспы выше, чем с эмбриональным вирусом. Он подавлял ЦПД вируса оспы в культуре клеток ЭЯП и ФЭК при дозе 10^3 БОЕ, при дозе 10^{-1} и 10^{-2} БОЕ, шт.«КП-85» полностью предотвратил развитие ЦПД.

Установлено, что предварительное заражение культур клеток фиксированным вирусом бешенства штамм «КП-85» предохраняло их от цитопатогенного действия вируса оспы птиц штамм «Баку». Вирус оспы нужно считать весьма удобным агентом для изучения феномена интерференции в клеточных системах с вирусом бешенства. Он вызывает выраженный ЦПД или образование бляшек в клеточной системе, и может быть индикатором для выявления вирусов хронической инфекции.

5. Инфекционность культуральных вирусов оспы птиц для цыплят.

Для оценки инфекционной активности культурального вируса оспы птиц штамм «Баку» в качестве контрольного штамма использовали штамм «К» вируса оспы кур производства ООО «НПП АВИВАК». В опытах, помимо культурального штамма вируса оспы птиц, был использован исходный эмбриональный штамм вируса оспы птиц для проведения сравнительного анализа. Биологическую активность вируса оспы птиц шт.«Баку» испытывали на двухмесячных клинически здоровых и восприимчивых к оспе (неиммунных и не

переболевших оспой) цыплятах, полученных из хозяйств, благополучных по заразным болезням. Для заражения цыплят использовали культуральный вирус десятого пассажа, адаптированного в культуре клеток ЭЯП и ФЭК с титром $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$. Заражение производили путем прокола перепонки крыла специальным четырехигольным инъектором в дозе $0,013-0,015 \text{ см}^3$ согласно техническим условиям. Реакцию учитывали в течении 30 дней. Положительная реакция характеризовалась образованием оспин на месте прокола. В результате проведенного опыта оказалось, что все штаммы вирусов оспы птиц уже на 5-тые сутки после заражения вызвали у цыплят характерный фолликулит. На шестой день оспенный фолликулит достигал максимального развития, а затем постепенно начинал угасать. При этом с первых же дней развития фолликулита была хорошо заметна разница в степени фолликулярной реакции у цыплят, зараженных культуральным и исходным штаммом вируса: первый вызвал более слабую реакцию. Проведенные эксперименты показали, что у всех цыплят, ранее подвергавшихся заражению культуральным и исходным вирусом оспы птиц, при повторном заражении вирусом фолликулярная реакция полностью отсутствовала. К 10 дню у них наступало полное выздоровление. Культуральный вирус оспы птиц штамм «Баку», у цыплят, по-видимому, создает достаточно напряженный иммунитет, предохраняющего их от заражения вирусом оспы кур.

6. Оценка антигенной активности вируса оспы птиц штамм «Баку» в сравнении со штаммом «К».

В результате проведенных исследований было выяснено, что штаммы вирусов оспы птиц уже на пятый день после заражения вызвали у цыплят характерный фолликулит. У всех иммунизированных птиц, с момента появления оспин каждые 24 часа отбирали пробы сыворотки, для реакции торможения гемагглютинации. Антигенная активность вируса оспы кур штамм «К» на пятый день иммунизации составляла $4 \lg_2$, а для культурального и эмбрионального вируса штамма «Баку» титр вируса на птице составлял от $3 \lg_2$ до $4 \lg_2$. На 6 -7 сутки титр вируса оспы птиц во всех вариантах поднялся до $6 \lg_2$. Следует отметить, что титры культуральных вариантов вирусов оспы

штамм «Баку» и «К» были выше 1:8, что предполагает наличие напряженного иммунитета, предохраняющего птиц от этой болезни.

Реактогенность культурального штамма «Баку» также испытывали на 70-ти дневных цыплятах. Для постановки опыта культуральным вирусом оспы птиц заражали по 5 цыплят. При введении вируса двухмесячным цыплятам, местную реакцию отмечали на 5-7 –ые дни после инфицирования птиц вирусом. На пятый день после заражения на месте прокола образовывались оспины. Наблюдали отек и гиперемированность прилегающей ткани, которая спустя 10-14 дней затухала.

Для определения безвредности вирус оспы в десятикратной дозе вводили цыплятам методом прокола в перепонку крыла. Цыплята находились под наблюдением 21 день со дня введения вируса. У всех цыплят проявлялась местная положительная реакция (оспины). Спустя 10 дней наблюдали полное их выздоровление, без проявления каких либо вторичных клинических признаков, что указывало на безвредность испытуемого антигена вируса оспы птиц. Нами было выяснено, что вирус оспы птиц сохранил исходную инфекционную активность после его длительного пассирования в клеточных системах ЭЯП и ФЭК. Это свидетельствовало о положительном влиянии длительного пассирования вируса в данных культурах клеток.

В целом, анализируя полученные данные, следует сказать, что культура клеток ЭЯП является чувствительной системой для культивирования вируса оспы птиц. Вирус оспы птиц штамм «Баку» в течение 25 пассажей в первично трипсинизированной клеточной системе ЭЯП, сохранил свои антигенные свойства. Клеточная система ЭЯП может быть использована в качестве модели для культивирования и аттенуации вируса оспы птиц, с дальнейшим ее применением в производстве средств иммунизации цыплят против болезни оспы.

ВЫВОДЫ

1. Осуществлено 25 успешных пассажа штамма «Баку» вируса оспы кур в культуре клеток ЭЯП. Активное размножение вируса в культуре клеток было подтверждено с помощью титрования в реакции гемагглютинации, а также на основе микроскопического

исследования цитопатогенных изменений в клеточных системах и на куриных эмбрионах.

2. Установлено накопление вируса при сравнительном культивировании в серийных пассажах штамма «Баку» в различных первичных клеточных культурах; в культуре клеток ФЭК с 5-го пассажа, и в культуре ЭЯП – с 10-го пассажа.
3. Адаптация штамма «Баку» к культуре клеток ЭЯП сопровождалась подъемом титра вируса ($8 \log_2$), и увеличением срока максимального накопления вируса (72 часа).
4. Установлена возможность применения метода образования бляшек для титрования вируса оспы птиц в культуре клеток ЭЯП.
5. Впервые для титрования вируса оспы птиц в культуре клеток применен феномен интерференции. При изучении феномена интерференции показана выраженная интерферирующая активность между фиксированным вирусом бешенства шт. «КП-85» и цитопатогенным вирусом оспы птиц штамм «Баку», этот метод также может быть использован при титровании вируса.
6. Установлены оптимальные условия размножения штамма «Баку» в культуре клеток ЭЯП и ФЭК: а) время адсорбции вируса 45-60 минут при 36-37°C; б) заражающая доза вируса - 10^4 ; в) использование среды «Игла-МЕМ» с содержанием 5% сыворотки крупного рогатого скота при температуре инкубирования 36-37 °С.
7. Доказана, высокая антигенная активность и апатогенность для цыплят культурального штамма «Баку» 25-го пассажа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сафаров Р.К., Юсифова К.Ю., Алиева Т.А. “Антирабические вакцины и методы их контроля”. //Труды Института Микробиологии НАНА, 2012, т.10, №1, с.319-331
2. Юсифова К.Ю., Сафаров Р.К., Алиева Т.А. Адаптация вируса оспы птиц штамм «Баку» к различным клеточным системам. //Труды Института Микробиологии НАНА, 2013, т.11, №1, с.216-223.
3. Юсифова К.Ю., Индикация вируса оспы птиц штамм «Баку» в культуре клеток ЭЯП». /“Gənc Alimlərin KT-da rolu: Problemlər və imkanlar” Beynəlxalq elmi konfrans. Bakı, 17-18 iyun 2014, с.188-189.

4. Юсифова К.Ю., Алиева Т.А., “Изучение активности вируса оспы птиц штамм «Баку» в зависимости от времени адсорбции в первичной культуре клеток»./ “Gənc Alimlərin KT-da rolu: Problemlər və imkanlar” Beynəlxalq elmi konfrans. Bakı, 2014, c.186-187.
5. Юсифова К.Ю., Сафаров Р.К., Алиева Т.А., «Вакцины применяемые для специфической профилактики оспы птиц»./ Beynəlxalq elmi praktik konfrans. Müasir aqrar elm: Qloballaşma şəraitində əsrin aktual problemləri və inkişaf perspektivləri. Gəncə 2014, s.11-15..
6. Юсифова К.Ю. “Актуальные проблемы специфической профилактики оспы птиц. // Azərbaycan Baytarlıq Həkimləri Assosiasiyası “Baytarlıq elmi praktiki jurnal”, 2014, №6, c.11-15.
7. Юсифова К.Ю. «Биологическая характеристика вируса оспы птиц в культуре клеток»./ ET İpəkçilik İnstitutu “Ağıclılığın inkişafına dair Azərbaycan-Türkiyə Elmi-tədqiqat əməkdaşlığı toplantısı” və Gənc alimlər şurasının II Beynəlxalq konfransı. Bakı,2015, c.148-151.
8. Юсифова К.Ю., Сафаров Р.К., Алиева Т.А.,Сравнительная характеристика чувствительности культуры клеток эмбрионов японских перепелов и фибробластов куриных эмбрионов к вирусу оспы птиц. / “Aqrar elmin və təhsilin innovativ inkişafı: dünya təcrübəsi və müasir prioritetlər” Beynəlxalq elmi-praktik konfrans. Gəncə, 2015, c.533-537.
9. Сафаров Р.К., Юсифова К.Ю., Алиева Т.А. Оптимальные условия размножения вируса оспы птиц в культуре клеток. // Журнал «Аграрная наука»(Россия), 2016, в.5, с.25-27.
- 10.Сафаров Р.К., Юсифова К.Ю., Алиева Т.А., “Антирабические вакцины и методы их контроля”./ Труды Института Микробиологии НАНА, 2016, т.14, №1, с.139-144.

KUBRA YUSİF QIZI YUSİFOVA

HÜCEYRƏ KULTURALARINDA QUŞLARIN ÇİÇƏK VIRUSUNUN YETİŞDIRİLMƏSİNİN OPTIMAL ŞƏRAİTİNİN ÖYRƏNİLMƏSİ

Quşların çiçək xəstəliyi geniş yayılaraq quşçuluq təsərrüfatlarına əhəmiyyətli dərəcədə iqtisadi ziyan vurur. Bu xəstəliklə əsas mübarizə üsullarından biri immunizasiyadır. Şirinov F.B. və Qocayev A.N. (1989) tərəfindən toyuqların çiçək xəstəliyinə qarşı virusun “Bakı” ştamından yüksək immunogenliyə malik embrional vaksin hazırlanmışdır. Lakin embrional vaksin müasir texnologiyaya cavab vermədiyindən onun təkmilləşməsinə, yəni kultural vaksinin istehsalına ehtiyac duyulurdu. Son illər bir çox infeksiya xəstəliklərinə qarşı kultural vaksinlər istifadəsi özünü doğrultmuşdur. Tədqiqat işin əsas məqsədi quşların çiçək virusu “Bakı” ştamını bildirçin rüşeymlərindən hazırlanmış hüceyrə kulturalarına uyğunlaşdıraraq quşların çiçək xəstəliyinin spesifik profilaktikası üçün istifadə oluna bilən yüksək dərəcədə fəal antigenin əldə edilməsidir. Çiçək virusunun bildirçin və toyuq rüşeym hüceyrə kulturalarında növbələmə passajları aparılaraq, ümumilikdə 25 passaj əldə olunmuşdur. Hüceyrə kulturalarında çiçək virusunun sitopatogen effektinin xüsusiyyətləri, onun yaranma vaxtı, dinamikası, virusun təsiri nəticəsində yaranan neqativ koloniyaların xüsusiyyətləri, quduzluq və çiçək virusları arasında interferensiya təsirləri öyrənilmişdir. Eyni zamanda çiçək virusunun hüceyrə sistemlərində yetişdirilməsinin optimal şəraitləri müəyyən edilmişdir: inkubasiya temperaturu $+36^{\circ}$ - $+37^{\circ}$ C; “İqla-MEM” mühitində iri buyuzlu heyvanların qan zərdabının miqdarı -5%; virusun adsorbsiya vaxtı 45-60 dəqiqə; pH 7,2 - 7,4. İki aylıq cüclər üzərində aparılan tədqiqatlar zamanı kultural çiçək virusunun “Bakı” şt. yüksək immunogenliyə və zərərsizliyə malik olduğu müəyyən olunmuşdur, ki bu da cüclərin, immunizasiyanın 6-cı günündə yoluxmadan qorunmasına səbəb olmuşdur. Əldə olunan nəticələrə görə quşların çiçək xəstəliyinə qarşı vaksinin istehsalında yapon bildirçini embrionunun hüceyrə kulturalarında bioloji model kimi istifadəsi təklif olunmuşdur.

KUBRA YUSİF YUSİFOVA

LEARNING THE OPTIMAL CONDITIONS CULTIVATION OF VIRUSES FOWL POX IN CULTURE CELLS

The fowl pox disease has a wide spread and significant economic damage to poultry farms. The main fight is vaccination with this disease. F.B.Shirinov and A.N.Qocayev (1989) developed embryonic vaccine against smallpox strain "Baku" have high immunogen. But embryonic vaccine did not meet modern technology and it was important to his improvement, and there was a need to manufacture a vaccine culture. Many infectious diseases against the use of vaccines culture self-justified last years.

The main purpose of the research study to obtain the highly active antigen - adapting smallpox viruses strain "Baku" to cell culture, made from quail embryos, can be used for specific prevention.

The smallpox virus on quail and chicken embryo cell cultures was achieved 25 passage. The characteristics cytopathogenic effect smallpox virus in cell cultures was studied, the time of its creation, dynamics, resulting from the negative impact of the virus colonies characteristics, interference effects between rabies and smallpox viruses.

At the same time, the optimal conditions smallpox virus was studied in cell systems: temperature incubation $+36^{\circ}$ - $+37^{\circ}$ C; in "Iqla-MEM" environment serum of cattle - 5 %; 45-60 minutes the time the virus adsorption; pH 7.2 - 7.4.

The research in 2 months old chickens been determined has high immunogenic and safety that the chicks, 6th day of the infection was the cause of the protection of immunization. This research has been proposed of the results for use as a biological model for production vaccines against smallpox poultry on quail and chicken embryo cell cultures.

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI

MİKROBİOLOGİYA İNSTİTUTU

Əlyazması hüququnda

KUBRA YUSİF QIZI YUSİFOVA

**HÜCEYRƏ KULTURALARINDA QUŞLARIN ÇİÇƏK
VİRUSUNUN YETİŞDİRİLMƏSİNİN OPTİMAL
ŞƏRAİTİNİN ÖYRƏNİLMƏSİ**

**3109.01 – Baytarlıq mikrobiologiyası, virusologiyası,
epizootologiyası, mikotoksikologiya ilə mikologiya və
immunologiyası**

**Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi
dərəcəsi almaq üçün təqdim
edilmiş dissertasiyanın**

A V T O R E F E R A T I

BAKI – 2016