

DOI:10.26104/NNTIK.2023.78.34.017

Кожамкулов Е.М., Копеев С.К., Тажикен С.Б., Садикалиева С.О., Еришебулов З.Д.

КАНАТТУУЛАР ТУМООСУНУН ЖОГОРКУ ПАТОГЕНДУУ ВИРУСУН
ӨСТҮРҮҮНҮН ОПТИМАЛДУУ ПАРАМЕТРЛЕРИН ИШТЕП ЧЫГУУ

Кожамкулов Е.М., Копеев С.К., Тажикен С.Б., Садикалиева С.О., Еришебулов З.Д.

ОТРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

Ye. Kozhamkulov, S. Kopeyev, S. Tazhiken, S. Sadikalieva, Z. Yershebulov

WORKING OUT OPTIMAL PARAMETERS OF CULTIVATION
OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS

УДК: 619:616.921.526.2

А тибиндеги канаттуулар тумоосунун вирусу адам менен жаныбарлардын эң маанилүү инфекциялык агенттеринин бири. Грипп вирусунун мындай жогорку потенциалы анын сегменттелген бир тилкелүү РНКнын болушунан улам тез эволюциясына байланыштуу. Сегменттелген геном аралаш инфекцияларда гендердин реассортациясынын негизи болуп саналат, анда вирустун жаңы варианттары пайда болот. Ушуга байланыштуу бул макалада канаттуулар тумоосунун вирусунун А/балапан/Росток/29 (АХРОСТОК) штаммын өстүрүүнүн төмөнкү параметрлери берилген: - өнүгүп келе жаткан тоок эмбриондорунун оптималдуу курагы (РКЭ) – 12 сутканы түздү, вирусунун 1000 ЭИД50/мл жуктуруучу дозасы, инкубациялоо температурасы $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, инкубациялоонун узактыгы 26-36 саат. Канаттуулар тумоосунун вирусунун А/балапан/Росток/29 (ОБИ7Н1) штаммын өстүрүүнүн көрсөтүлгөн параметрлерин сактоодо инфекциялык жана гемагглютинациялоочу активдүүлүгү 11,40 оэд50/мл 1:4096 кем эмес вируссуз суспензияны алууга болот, бул канаттуулардын Жогорку патогендуу тумоосуна каршы инактивацияланган вакцинаны даярдоодогу коюлган талаптарга толук шайкеш келет.

Негизги сөздөр: канаттуулар тумоосу, вакцина, штамм, тоок эмбриондору, вирус, параметрлер, гемагглютинин, өстүрүү, жуктуруучу доза, биологиялык активдүүлүк.

Вирус гриппа птиц типа А является одним из важнейших инфекционных агентов человека и животных. Столь высокий потенциал вируса гриппа связан с его быстрой эволюцией, обусловленной наличием сегментированной одно-цепочной РНК. Сегментированный геном является основой для реассортации генов при смешанных инфекциях, в ходе которых возникает возможность появления новых вариантов вирусов. В этой связи в данной статье представлены следующие параметры культивирования штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) вируса гриппа птиц: - оптимальный возраст развивающихся куриных эмбрионов составило (РКЭ) – 12 суток, заражающая доза вируса 1000 ЭИД50/мл, температура инкубирования $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, продолжительность инкубирования 26-36 часов. При соблюдении указанных параметров культивирования штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) вируса гриппа птиц возможно получить вируссодержащую суспензию с инфекционной и гемагглютинирующей активностью не менее 11,40 Ig ЭИД50/мл 1:4096 что вполне соответствует предъявляемым требованиям при изготовлении инактивированной вакцины против высокопатогенного гриппа птиц.

Ключевые слова: грипп птиц, вакцина, штамм, куриные эмбрионы, вирус, параметры, гемагглютинин, культивирование, заражающая доза, биологическая активность.

Avian influenza virus type A is one of the most important infectious agents of humans and animals. Such a high potential of the influenza virus is associated with its rapid evolution due to the presence of segmented single-stranded RNA. The segmented genome is the basis for the reassortment of genes in mixed infections, during which there is a possibility of the emergence of new variants of viruses. In this regard, this article presents the following parameters of cultivation of strain A/chicken/Germ/29 (H7N1) of avian influenza virus: - the optimal age of developing chicken embryos was 12 days, the infecting dose of the virus is 1000 EID50/ml, incubation temperature is $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, incubation duration is 26-36 hours. Subject to the specified parameters of cultivation of strain A/chicken/Germ/29 (H7N1) of avian influenza virus it is possible to obtain a virus-containing suspension with an infectious and hemagglutinating activity of at least 11.40 Ig EID50/ml 1:4096, which fully meets the requirements for the manufacture of an inactivated vaccine against highly pathogenic avian influenza.

Key words: avian influenza, vaccine, strain, chicken embryos, virus, parameters, hemagglutinin, cultivation, infecting dose, biological activity.

Введение. В настоящее время грипп птиц распространен во многих странах азиатского, американского и европейского континентов. Анализ опубликованных данных по высокопатогенному гриппу птиц показывает, что большинство известных эпизоотических вспышек гриппа птиц за последние 80 лет вызваны вирусами с подтипами гемагглютинаина H5 и H7 [1-3].

Несмотря на прогресс в биотехнологии и фундаментальной иммунологии грипп, по настоящее время стал – социально – экономической проблемой. Проникая из резервуара естественных хозяев, вирус гриппа А, инфицирует разные виды птиц и млекопитающих, а в дальнейшем может получить способность передаваться человеку и вызывать новое заболевание. Основная причина этого связана с полиэтиологичностью возбудителей, естественной изменчивостью их генома, приводящих к изменению структуры и свойств вирионных белков [4].

Вакцинопрофилактика – ведущий метод борьбы с вирусными инфекциями. Она способствует снижению экономических потерь во всем мире из-за снижения заболеваемости и смертности. Стратегическая цель профилактических мероприятий состоит в том,

чтобы каждая страна должна сама обеспечить иммунологическую защиту против инфекций. Для решения этих задач необходимы научные исследования с целью ускорения разработки новых вакцин для каждого независимого государства [5-8].

Принимая во внимание географическую расположенность территории Республики Казахстан на путях перелета диких птиц и значительное распространение гриппа не только среди птиц, остро стоит вопрос угрозы возникновения нового подтипа гриппа. Данная проблема представляет стратегическую значимость в области обеспечения биологической безопасности страны, а вопрос обеспечения населения Казахстана собственной вакциной против гриппа птиц имеет важнейшее государственное значение.

Эти данные создают объективные предпосылки для разработки технологии изготовления эффективных вакцин против гриппа птиц в Казахстане. Предлагаемая работа посвящена отработке оптимальных культуральных свойств вируса гриппа птиц и получения высокоактивного вирусосодержащего материала, дальнейшем используемого при разработке технологии изготовления инактивированной вакцины [9,11].

Материалы и методы.

- вирулентный штамм А/цыпленок/Росток/29-(H7N1) вируса гриппа птиц;

- развивающиеся куриные эмбрионы 10-13 сут. Возраста (РКЭ);

Культивирование вируса гриппа птиц из штамма

А/цыпленок/Росток/29(H7N1) проводили на РКЭ заранее установленным параметрам культивирование [13], на 12 суточного возраста из Талдыкорганской птицефабрики ТОО Когер ЛТД под брендом «Ак-Кус» кросса Ломан-ЛСЛ. Инфицирование РКЭ проводили в аллантоисную полость в объеме 0,2 мл. Для определения оптимальной заражающей дозы вируса РКЭ 12 сут. возраста инфицировали в дозе от 10,0 до 100000 ЭИД_{50/мл} и инкубировали при 36±0,5, в течение 70 час. После определения заражающей дозы проводили подбор оптимального возраста РКЭ, в работе использовали 10,11,12,13 сут РКЭ. Далее проводили подбор оптимального температурного режима инкубирования, с этой целью инфицированные РКЭ инкубировали при температуре 34±0,5, 36±0,5, 37±0,5 и 38±0,5°С. Уровень накопления вируса оценивали методом титрования и постановки РГА.

Титр вируса выражали в lg ЭИД_{50/мл}, который рассчитывали по методу Рида и Менча [12].

Результаты и обсуждение. С этой целью нами было решено получить высокоактивный вирусный материал на первом этапе на развивающееся куриных эмбрионы 12 сут возраста, инфицировали в дозах от 10 до 100000 ЭИД_{50/мл}. Результаты проведенных исследований определяли уровень накопления вируса в зависимости от дозы заражения эмбрионов, по определению инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса в зависимости от заражающей дозы. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Определение накопления вируса гриппа птиц с разными дозами заражения

Доза заражения, ЭИД ₅₀	Количество эмбрионов, погибшие/всего в опыте	Время гибели эмбрионов, ч	Активность	
			Гемагглютинирующая	Инфекционная, lg ЭИД _{50/мл} (X±m), n=3
10	20 / 10	32-70	1:64	7,0±0,14
100	20 / 20	24-42	1:256	9,7±0,08
1000	20 / 20	24-36	1:4096	11,40±0,07
10000	20 / 20	20-24	1:1024	8,0±0,14
100000	20 / 20	10-18	1:128	6,0±0,14

Данные таблицы 1 показывают, что максимальный уровень накопления вируса при инфицировании эмбрионов в дозе 1000 ЭИД_{50/мл}. Увеличение дозы вируса на эмбрион не привело к прогрессивному увеличению инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса. Определено сроки гибели эмбрионов от дозы заражения вируса. С повышением дозы вируса отмечалась гибель эмбрионов, начиная с 10 ч. после заражения, и сравнительно низкая инфекционная активность вируса. В дозе ниже 100 ЭИД₅₀ 50% инфицированных эмбрионов оставались живыми. От живых эмбрионов отбирали пробы и ставили реакцию капельным методом вирус в эмбрионах не выявлялся.

Исходя из вышеизложенного, отработано заражающая доза для вируса гриппа птиц, принята 1000 ЭИД_{50/мл}. Из литературных источников установлено, что при инфицировании 10 сут. РКЭ в дозах от 1000 до 100000 ЭИД_{50/мл} рекомбинантными штаммами вируса гриппа, гибель эмбрионов в процессе инкубирования практически отсутствует [14].

В следующих опытах нами было поставлено задача определить уровень накопления вируса в зависимости от возраста инфицированных эмбрионов. Для этого отобрали 10, 11, 12 и 13 суточного возраста развивающиеся куриных эмбрионы (РКЭ) инфицировали заранее отработанной дозе. Учитывая от возраста

используемых эмбрионов, имеющих большую практическую значимость в технологии изготовления производственных серий вакцин для против вируса гриппа птиц, с этой целью одновременно определяли объем

собираемой вирусной аллантоисной жидкости с каждого эмбриона. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Определение накопления вируса гриппа птиц в зависимости от возраста эмбрионов

Возраст эмбрионов, сут.	Количество эмбрионов погибшие / всего в опыте	Время гибели эмбрионов, час	Активность		Средний объем, аллантоисной жидкости, мл
			Гемагглютинирующая	Инфекционная, lg ЭИД _{50/мл} (X±m), n=3	
10	20 / 20	20-24	1:1024	8,11±0,15	2,8±2
11	20 / 20	22-26	1:1024	9,2±0,08	5,0±1,2
12	20 / 20	24-37	1:4096	11,40±0,07	9,0±1,3
13	20 / 18	24-45	1:512	8,45±0,07	5,0±1,2

По результатам таблицы 2 можно сказать, что уровень накопления вируса зависит от возраста инфицированных куриных эмбрионов (РКЭ). Максимальный уровень накопления вируса, а также наибольший объем вирусосодержащей аллантоисной жидкости получен на 12 суточных эмбрионах. При этом средний объем аллантоисной жидкости составил 9,0 мл, что эти показатели больше, чем при инфицировании 10, 11, 13-суточных (РКЭ). С увеличением возраста куриных эмбрионов продлевались сроки их гибели, что способствовало максимальному накоплению вируса.

Далее определяли уровень накопления вируса

гриппа птиц в зависимости от температуры инкубирования инфицированных развивающегося куриных эмбрионов. С этой целью эмбрионы 12 сут возраста инфицировали в дозе 1000 ЭИД_{50/мл} и инкубировали при температуре 34±0,5, 36±0,5, 37±0,5 и 38±0,5°C. Срок инкубации инфицированных в разных температурно-временных режимах продлился до 40 ч. В асептических условиях были взяты пробы для исследования инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса гриппа птиц. Результаты исследований приведены в таблице 3.

Таблица 3

Определение накопления вируса гриппа птиц разных температурно-временных режимах инкубирования.

Температура инкубирования, °С	Количество эмбрионов погибшие / всего в опыте	Время гибели эмбрионов, час	Активность	
			Гемагглютинирующая	Инфекционная, lg ЭИД _{50/мл} (X±m), n=3
34±0,5	20 / 15	26-38	1:1024	9,45±0,07
36±0,5	20 / 20	24-32	1:4096	11,40±0,07
37±0,5	20 / 20	22-26	1:512	9,3±0,15
38±0,5	20 / 20	20-26	1:1024	8,61±0,15

Как видно таблицы 3, что отработано параметры инкубирования разных температурно-временных режимах. Температура существенно влияет на уровень накопления вируса при инкубировании на инфицированных (РКЭ). Оптимальная условия культивирования вируса гриппа птиц при температуре 36±0,5°C. По данным литературных источников при исследования оптимальных параметров культивирования для рекомбинантных штаммов на 10 суточных РКЭ. Уровень накопления вируса гриппа осуществляется в течение 48 часов при температуре 35±0,5°C - 36±0,5 °C. Инфекционная и гемагглютинирующая активность

рекомбинантных штаммов ниже в сравнении вирусulentными штаммами вируса гриппа птиц [14].

В наших экспериментах установлено, что вирусulentный штамм А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) вируса гриппа птиц при соблюдение отработанных параметров вызывает гибель РКЭ с 26 по 36 часы после инфицирования, при этом гибель эмбриона является маркером окончания срока культивирования.

Выводы: В заключении можно сказать все оптимальные параметры культивирования вируса гриппа птиц отработаны в полном объеме что, позволяет получить высокоактивный вирусосодержащий материал,

для приготовления инактивированной вакцины против высокопатогенного гриппа птиц подтипа H7.

Литература:

- World Health Organization (WHO), 2006. http://www.who.int/crs/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_04_4/en/index/html
- Butler D. Alarms ring over bird flu mutations //Nature. - 2006.-Vol.439, 19 January. -P.248-249.
- Capua I., Cattoli G., Marangon, S., Bortolotti L. & Ortali G. (2002). Strategies for the control of avian influenza in Italy. Vet. Rec., 150, 223
- Lin Y.P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses // Virus Research. –2004. – Vol.03, – P. 47-52.
- Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцино профилактика вирусных инфекций от Э.Дженнера до настоящего времени. // Вопросы вирусологии. - 2012. - №1. - С. 33-42.
- AndreF.E., Booy R., Bock H.L., Клеменс J., Datta S.K., Джон Т.Дж., Lee B.W., Lolekha S., Peltola H., Ruff T.A., Santosham M., Schmitt H.J. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide // Bull World Health Organ. - 2008. - Vol. 86, №2. - P. 140-146.
- Osterholm M. Preparing for the next pandemic // New England Journal of Medicine. - 2010. - Vol. 352, №18. - P. 1839-1842.
- Belshe RB. The origins of pandemic influenza – lessons from the 1918 virus // New England Journal of Medicine. – 2009. – Vol. 353, №21. - P. 209-2211.
- Beard C.W., Schnitzlein W.M. & Tripathy D.N. (1991). Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Dis.*, 35, 356–359
- Capua I., Terregino C. Cattoli G., Mutinelli F. & Rodriguez J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.*, 32, 47–55.
- Qiao C.L., Yu K.Z., Jiang Y.P., Jia Y.Q., Tian G.B., Liu M., Deng G.H., Wang X.R., Meng Q.W. & Tang X.Y. (2003). Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol.*, 32, 25–31
- Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. (1991). Ветеринарная вирусология.
- Молдагулова Н.Б., Кыдырбаев Ж.К., Усубалиев А., Кожамкулов Е.М., Кожаканулы А. (2011) Изучение культуральных свойств вируса гриппа птиц подтипа H7N1 на эмбрионах. Вестник КАЗНУ. №2(48) часть 1, 190-193стр
- A. Mailybayeva., A.S. Nurpeisova., N.N. Assanzhanova., Y.M. Kozhamkulov., D.A. Inkarbekov., R. T. Abitayev., K. K. Jekebekov., S.Sh. Nurabayev., M.M. Kassenov., B.M. Khairullin., Zh. Kydyrbayev., A. Valdovska., K.D. Zakarya. optimization of cultivation condition of subtype h5 flu virus. bulletin of national academy of sciences of the republic of kazakhstan. Volume 6, Number 388 (2020), 71-77.
- Эркинова З.Э., Джапаралиев Н.Т. Культивирование вируса ящура типов А и О. / Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2022. №. 3. С. 167-170.