

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ НА ЭМБРИОНАХ КУР

Большаков С.А., Кулешов Д.Б.

ОАО «БелВитунифарм», г. Витебск, Республика Беларусь

***Аннотация.** В статье изложены этапы выращивания высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) в эмбрионах кур и изучение его антигенных свойств на цыплятах. Исходным материалом для получения эмбрионального вируса ВГП служил штамм «Витебский» с формулой H5N1 выделенный от павшей дикой утки. В качестве системы выращивания использовали 9-10 дневные куриные эмбрионы.*

***Ключевые слова.** Грипп птиц (ВГП), эмбрион кур, аллантоисная полость, заражающая доза, вирус, иммунизация.*

CULTIVATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS ON CHICKEN EMBRYOS

Bolshakov S.A., Kuleshov D.B.

JSC "BelVitunifarm", Vitebsk, Republic of Belarus

***Abstract.** The article describes the stages of growing highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in chicken embryos and studying its antigenic properties in chickens. The initial material for obtaining the embryonic VGP virus was the Vitebsk strain with the formula H5N1 isolated from a fallen wild duck. 9-10 day old chicken embryos were used as a growing system.*

***Keywords.** Avian influenza (HSV), chicken embryo, allantois cavity, infecting dose, viruses, immunization.*

Введение. Целью настоящей работы являлось выращивание высокопатогенного вируса гриппа птиц (ВГП) в эмбрионах кур и изучение его антигенных свойств на цыплятах. Исходным материалом для получения эмбрионального вируса ВГП служил штамм «Витебский» с формулой H5N1 выделенный от павшей дикой утки. В качестве системы выращивания использовали 9-10 дневные куриные эмбрионы.

Основная часть. При определении оптимальной дозы вируса вызывающую наибольшее накопление вируса использовали 9-10 дневные СПФ - и товарные эмбрионы кур, полученные от не вакцинированных и вакцинированных птиц родительских стад иммунизированных

инактивированной вакциной против ВГП (H5N1) (ФКП «Ставропольская биофабрика»). Эмбрионы кур заражали в аллантоисную полость вирусом второго пассажа в дозах 1 тыс., 10 тыс., 100 тыс. и 1 млн. ЭИД₅₀/0,1мл. Заражённые эмбрионы культивировали при 37°C в течении 120 часов. Отбор павших эмбрионов проводили через 24, 48, 72, 96 и 120 часов. Отобранный вирусный материал изучали на инфекционную и гемагглютинирующую активность. Результаты опыта приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты изучения инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса гриппа

Происхождение эмбрионов	Доза заражения (ЭИД ₅₀)			
	1 млн.	100 тыс.	10тыс.	1 тыс.
Количество павших эмбрионов:				
- СПФ (%)	100	100	100	100
- Товарных не вакцинированных родителей	100	100	100	85
- Товарных от вакцинированных родителей	100	100	20	---
Время падежа (час):				
-СПФ (%)	24	24	24-48	48-72
-Товарных не вакцинированных родителей	24	24	24-48	72
-Товарных от вакцинированных родителей	24	24-48	96-120	---
Инфекционная активность Ig ЭИД ₅₀ /мл:				
-СПФ (%)	9,75	9,75	9,75	9,75
-Товарных не вакцинированных родителей	9,75	9,50	9,25	9,25
-Товарных от вакцинированных родителей	9,75	9,25	9,50	---
Гемагглютинирующая активность:				
-СПФ (%)	1:512	1:512	1:1024	1:1024
-Товарных не вакцинированных родителей	1:512	1:512	1:512	---
-Товарных от вакцинированных родителей	1:512	1:512	1:512	---

При исследовании влияние заражающей дозы вируса на СПФ эмбрионы и эмбрионы с товарных ферм не содержащие материнских антител было установлено, что с уменьшением заражающей дозы вируса увеличивается время наступления гибели эмбрионов кур. Так, при заражении эмбрионов дозой 1 млн., 100 тыс. ЭИД₅₀ гибель эмбрионов наступало через 24 часа.

Уменьшение заражающей дозы до 10 тыс. ЭИД₅₀ сопровождалось увеличением времени наступления гибели эмбрионов до 24-48, а при 1 тыс. ЭИД₅₀ - через 48-72 часов. При всех испытанных дозах заражения инфекционная активность вирусной суспензии, полученной от павших эмбрионов была равна 9,5-9,75 lg/мл., а гемагглютинирующая активность равнялась 1:512. Наиболее высокая гемагглютинирующая активность была у СПФ эмбрионов, заражённых 10 тыс. и 1 тыс. ЭИД₅₀ и составляла 1:1024. С учетом полученных результатов оптимальной заражающей дозой для этих двух групп эмбрионов следует считать 10 тыс. ЭИД₅₀.

При исследовании влияния дозы вируса на показатели вирусного материала, полученного от эмбрионов кур, содержащих материнские антитела, установлено, что оптимальной дозой заражения была доза не менее 100 тыс. LgЭИД₅₀ на эмбрион. Уменьшение заражающей дозы до 10 тыс. ЭИД₅₀ вызывала гибель только 20 % эмбрионов через 96-120 часов. Снижение заражающей дозы вируса до 1 тыс. ЭИД₅₀/мл не вызывала гибель эмбрионов. Титр инфекционной и гемагглютинирующей активности вирусного материала от павших эмбрионов, заражённых различными дозами вируса, был практически одинаков во всех пробах и равнялся 9,0-9,75 Lg ЭИД₅₀/мл и 1:512, соответственно.

Таким образом, проведенные исследования показали, что для наработки вирусного материала ВГП можно использовать как СПФ эмбрионы кур, так и товарные эмбрионы без материнских антител и с материнскими антителами. Оптимальной заражающей дозой для СПФ и товарных эмбрионов не содержащих материнских антител является 10 тыс. ЭИД₅₀, а для эмбрионов, содержащих материнские антитела 100 тыс. ЭИД₅₀.

При определении антигенной активности вирусных антигенов полученных на эмбрионах кур в качестве тестируемых систем для изготовления вакцин нами были выбраны вирусные суспензии, полученные на куриных эмбрионах, не содержащих и содержащих материнские антитела.

Вирусную суспензию инактивировали 0,1% формалином, очищали от балластных компонентов методом низкоскоростного центрифугирования при 5 тыс. об/мин. Очищенную суспензию вирусного антигена смешивали с масляным адьювантом ISA-70 в соотношении 30 к 70 (по весу). Исследования вакцин проводили на 3 группах цыплят, 50-60 дневного возраста, не содержащих антител к ВГП подтипа Н5. Цыплят прививали внутримышечно в дозе 0,5 мл.

Отбор крови для исследований проводился на 21 сутки после вакцинации. Количество антител оценивали в ИФА. Результаты испытаний экспериментальных серий вакцин изготовленных на основе вирусных материалов эмбрионов кур и культур клеток МДСК - представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты испытаний экспериментальных серий вакцин изготовленных на основе вирусных материалов эмбрионов кур и культур клеток МДСК

№	Вирусный материал:	Титр вируса до инактивации lg ЭИД ₅₀ /мл	Гемагглютинирующая активность	Титр в ИФА на 21 сутки после иммунизации
1	КЭ не содержащих материнские антитела	9,5±0,23	1:512	8973±325
2	КЭ с материнскими антителами	9,25±0,43	1:512	1:8264±376
3	Контроль	---	---	1:849±321

**Примечание- проходной титр 1:2134*

Полученные данные свидетельствуют о том, что иммунизация цыплят препаратами из вирусов, полученных на эмбрионах кур, не содержащих материнские антитела, индуцирует у птицы на 21 сутки после введения вакцины образование антител против гриппа птиц с титром 8973±325 (превышает защитный титр в 4 раза). У цыплят, вакцинированных вакциной, изготовленной из вируса, полученного на эмбрионах кур с материнскими антителами также формировался высокий гуморальный иммунитет с титром антител 1:8264±376, т. е. способным защитить цыплят от заражения.

Заключение. Результаты опытов показали, что эмбрионы кур, полученные от не вакцинированных и вакцинированных против гриппа H5 родительских стад, могут использоваться для получения вирусного материала при изготовлении эффективной вакцины для профилактики ВГП подтипа H5.

Список использованной литературы

1. Зыков С. А. *Высокопатогенный грипп птиц // Эффективное животноводство. 2019. № 4 С. 152–160.*
2. Brygoo E. R. *Human Diseases and Their Relationship to the Environment // Monographiae Biologicae. 1972. V. 21. P. 111–143.*

3. Samantha J. L., Duchatel F., Digard P. A. Brief history of bird flu // *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2019. V. 5, № 16. P. 374.

4. Pereira H. G. Tumova B., Webster R. G. Antigenic Relationship between Influenza A Viruses of Human and Avian Origins // *Nature*. 1967. V. 215, № 5104. P. 982-983.

5. Webster R., Walker E. Influenza: The world is teetering on the edge of a pandemic that could kill a large fraction of the human population // *American Scientist*. 2003. V. 91, № 2. P. 122-129.

УДК 619:579

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК МДСК С ПОСЛЕДУЮЩИМ ИХ ВОСТАНОВЛЕНИЕМ ИЗ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Кулешов Д.Б. Большаков С.А.

ОАО «БелВитунифарм», г. Витебск, Республика Беларусь

Аннотация. В статье представлены результаты исследований, проведенных с целью оптимизации режимов криоконсервирования и восстановления из глубокой заморозки (-196°C) клеток МДСК. Клетки выращивали в 1,5 – литровых матрасах на питательной среде Игла (МЭМ) с 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Ключевые слова. Криоконсервирование, монослой, надосадок, криосреды.

CRYOPRESERVATION OF TRANSPLANTED MDSC CELLS WITH THEIR SUBSEQUENT RECOVERY FROM DEEP FREEZING

Kuleshov D.B., Bolshakov S.A.

JSC "BelVitunifarm", Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. The article presents the results of studies conducted to optimize cryopreservation and recovery modes from deep freezing (-196°C) of MDSC cells. The cells were grown in 1.5-liter mattresses on an Iгла (MEM) nutrient medium with 10% bovine serum.

Keywords. Cryopreservation, monolayer, superimposition, cryomediation.

Введение. Широкий спектр клеток, имеющих биологическое, медицинское и ветеринарное значение, можно криоконсервировать при