

ОСВЕЖЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА В КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ И ПРОВЕРКА ЕГО ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ НА ЦЫПЛЯТАХ

С.С. Килибаев *, М.К. Кенжебаева , М. Мамбеталиев , М.А. Азанбекова ,
А.Д. Валиева , Н.А. Сарсенкулова , М.С. Туысканова , Д.И. Музарап , Ш.Т.
Табыс , Б.Б. Кадырова , А.А. Ашимова , К.Д. Жугунисов 

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт Гвардейский, Казахстан

*s.kilibayev@biosafety.kz

Аннотация. Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов. В связи с этим в данной статье представлены результаты исследования по освежению штамма возбудителя одного из таких инфекционных заболеваний, как вирулентный вирус болезни Ньюкасла (ВБН) в развивающиеся куриных эмбрионах (РКЭ) и определение его патогенной активности на цыплятах.

За 9 лет хранения биологическая активность штамма «Т-53» ВБН снизилась до 1,74 lg ЭИД₅₀/мл. В результате проведенных трех последовательных пассажей в РКЭ биологическая активность штамма повысилась до приемлемого уровня, который позволяет длительному хранению. Затем наработанная вирусосодержащая суспензия (ВСС) лиофилизирована с добавлением защитной среды согласно паспортным данным штамма. Качество лиофильно высушенного штамма оценено по следующим основным показателям, таким как: внешний вид, наличие посторонней примеси, плесени и трещин ампул, наличие вакуума, растворимость, концентрации водородных ионов, массовая доля влаги, стерильность в отношении бактериальных, грибковых и микоплазменных контаминантов, биологическая активность и патогенность.

Проверка показала соответствие физико-химических и биологических свойств освеженного образца штамма «Т-53» ВБН с данными, заложенными в паспорте штамма.

Ключевые слова: вирус, штамм, болезнь Ньюкасла, патогенность, освежение, защитная среда, лиофилизация.

Введение. Среди инфекционных болезней, наносящих значительный экономический ущерб птицеводству, особое место занимает болезнь Ньюкасла (БН) из-за его высокой контагиозности [1]. Последние годы вирус болезни Ньюкасла представляет повышенный интерес не только из-за высокого потенциала патогенности, но и вследствие обнаружения его онколитической способности и использованием в качестве вектора вакцины как для людей, так и для животных [2, 3].

Вирус болезни Ньюкасла относится к отряду *Mononegavirales*, семейству *Paramyxoviridae*, подсемейству *Paramyxovirinae* и роду *Avulavirus* [4, 5]. Это оболочечный вирус, содержащий одноцепочечный РНК-геном с отрицательной полярностью который состоит из 15 200 нуклеотидов, содержащий шесть генов, кодирующих семь белков [6, 7]. Род *Avulavirus* делится на девять серотипов на основе анализов торможения гемагглютинации (РТГА) и торможения нейраминидазы. ВБН относится к серотипу 1 птичьих парамиксовирусов [8, 9].

Вирус относительно стабилен в природе даже при субоптимальной температуре и широком диапазоне pH. Однако было замечено, что ВБН становится нестабильным при температуре 56 °C [3]. Вирус чувствителен к липидосодержащим веществам, детергентам, формальдегиду и окислителям [10].

С целью применения в обеспечении биологической безопасности страны, в коллекции микроорганизмов ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической

безопасности» хранятся и поддерживаются возбудители ряда инфекций, используемые для разработки профилактических и диагностических средств против опасных инфекций. Эти штаммы микроорганизмов периодически подвергаются проверке остаточной биологической активности и по необходимости освежаются на чувствительных системах культивирования. Необходимость сохранения оригинальных штаммов вирусов на многие десятилетия без изменений их первоначальных свойств как молекулярной, антигенной и генетической структуры, иммуногенной потенции, являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов.

В связи с этим, освежение и поддержание вирулентного (контрольного) штамма ВБН в высокоактивном состоянии является немаловажной частью при производстве вакцинных и диагностических препаратов.

Цель исследования: Восстановление биологических свойств контрольного штамма ВБН путем освежения в чувствительной системе культивирования с последующей проверкой его физико-химических, биологических свойств на соответствие с паспортными данными.

Материалы и методы исследования

Проверка остаточной биологической активности патогенного вируса болезни Ньюкасла и его освежение

Для проведения исследований был использован вирулентный штамм «Т-53» вируса болезни Ньюкасла, хранящийся в условиях коллекции в течение 9 лет. В начальном этапе исследования определена остаточная биологическая активность штамма методом титрования на 11 сут. РКЭ. Для титрования приготовлены разведения штамма вируса по общепринятой методике от 10^{-1} до 10^{-8} и разведениями вируса заражены в аллантоисную полость (АП) РКЭ в объеме по 0,1 мл. Титр вируса оценивали в реакции гемагглютинации (РГА) качественным методом с использованием 1 % взвеси эритроцитов петуха [11].

Освежение штамма проведено на 11 сут. РКЭ путем 3 последовательных пассажей.

Титр вируса вычисляли по методу Reed L.J. и Muench H.A. [12]. Проверка на контаминацию бактериальных, грибковых микрофлор и микоплазм проводили согласно ГОСТ 28085 [13].

Лиофилизация, технический и биологический контроль освеженного штамма вируса болезни Ньюкасла

До лиофильного высушивания к наработанной освеженной вирусосодержащей суспензии добавляли защитную среду (обезжиренное молоко КРС) в соотношении 1:1 и разлили по ампулам и высушивали. Лиофилизацию проводили в течение 22 - 24 часов в лиофильной установке (Labconco, США) в автоматическом режиме при температуре минус 45-50 °С с уровнем вакуума в камере лиофильной сушки 25 - 45 Па. После высушивания ампулы запаивали при остаточном давлении 15 - 30 Па на карусельно-коллекторном аппарате. Наличие вакуума в запаиваемых ампулах проверяли по ГОСТ 28083–2012, массовой доли влаги штамма - по ГОСТ 24061, бактериологический контроль стерильности - по ГОСТ 28085 [13].

Опыты на цыплятах

Для оценки патогенных свойств штамма опыты проведены на цыплятах 45 сут. возраста в специальных помещениях-вивариях, которые соответствуют условиям биологической безопасности (ABSL-2) для окружающей среды и персонала. Перед опытом сыворотки крови цыплят были исследованы на наличие вирус нейтрализующих антител против болезни Ньюкасла в РТГА с использованием эритроцитов петуха [14]. Патогенность на цыплятах определяли методом титрования от 10^{-1} до 10^{-9} разведением вируса на каждое разведения по 4 гол серонегативных к вирусу цыплят, которым вирус вводили внутримышечно в область груди по 1 мл. Содержание инфицированных цыплят проводили в разных боксах вивария в соответствии с разведением вируса. В течение опыта ежедневно проводили наблюдение за инфицированными цыплятами. При этом внимание обращали на общее состояние цыплят, на наличие клинических признаков болезни, аппетит и т.п. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Reed L.J. и Muench H.A. [12] и выражали в $\lg \text{ЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Биоэтика

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями биоэтики по работе с лабораторными животными. План эксперимента был утвержден локальной комиссией по биоэтике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности

(протокол №2 от 25 июня 2024 года).

Результаты

Определение остаточной биологической активности и освежение вирулентного штамма «Т-53» вируса болезни Ньюкасла

Остаточную биологическую активность штамма «Т-53» ВБН определяли методом титрования вируса на 11 сут. РКЭ. Титр активности вируса определяли в РГА по наличию гемагглютининов в аллантоисной жидкости инфицированных эмбрионов. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Биологическая активность образцов штамма вируса болезни Ньюкасла на 11 сут РКЭ

Наименование штамма	Биологическая активность, lg ЭИД ₅₀ /мл			
	исходная по паспорту	остаточная	вирусодержащей суспензии до сушки	после сушки
«Т-53»	8,44± 0,8 РГА 1:512	6,70 ± 0,14 РГА 1:256	8,45 ± 0,14 РГА 1:512	8,23 ± 0,17 РГА 1:512

Из данных таблицы 1 видно, что за период хранения остаточная биологическая активность вирулентного штамма «Т-53» вируса болезни Ньюкасла составила (6,70 ± 0,14) lg ЭИД₅₀/мл с гемагглютинирующей активностью 1:256, при исходной биологической активности – 8,44 lg ЭИД₅₀/мл. При этом за 9 лет хранения активность штамма снизилось на 1,74 lg.

С целью освежения штамма вируса было проведено 3 последовательные пассажи на РКЭ 11 сут. возраста. В результате чего титр вируса повысился до (8,45 ± 0,14) lgЭИД₅₀/мл с гемагглютинирующей активностью 1:512. Проверка вирусосодержащей суспензии освеженного штамма на контаминацию бактериальными, грибковыми микрофлорами и микоплазмами показала стерильность в отношении выше указанных контаминантов.

Для подготовки штамма к долгосрочному хранению, наработанную вирусную суспензию в асептических условиях объединили с защитной средой в соотношении 1:1 и лиофилизировали. Ампулы с высушенным вирусным материалом запаивали на аппарате при остаточном давлении 15-30 Па. Запаиваемые ампулы проверяли визуально на отсутствие трещин и на наличие вакуума аппаратом Д'Арсонваля. При этом в ампулах отмечены фиолетовое свечение с потрескивающим звуком, что свидетельствовало о наличии вакуума. Растворимость лиофильно высушенного штамма вируса на физиологическом растворе хлористого натрия составил 90 сек., а pH среды – 7,4. Остаточная массовая доля влаги в материале составила 2,6 %. Биологическая активность высушенного образца штамма составила (8,23±0,17) lg ЭИД₅₀/мл с титром гемагглютинирующей активности 1:512.

Проверка патогенных свойств освеженного штамма «Т-53» вируса болезни Ньюкасла на цыплятах

Для проверки патогенных свойств освеженного штамма ВБН использовали цыплят 45 сут. возраста, которых инфицировали заранее приготовленными на физиологическом растворе десятикратными разведениями от 10⁻¹ до 10⁻⁹. Каждое разведение вируса ввели 4 цыплятам внутримышечного (в грудную мышцу) по 1 мл. За инфицированными цыплятами вели наблюдение в течении 14 сут.

Результаты титрования вируса на цыплятах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Патогенная активность освеженного штамма «Т-53» вируса болезни Ньюкасла для цыплят

Наименование штамма, дата изготовления и кол-во пассажа	В/М заражение цыплят по 1 мл в область грудинки (разведение вируса)									Биолог. активн., lg ЛД ₅₀
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
«Т-53» от 17.07.2024 г. 8-пасс. на РКЭ	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ -+	-- --	8,25

Примечания:

1 «-» - отрицательный результат;

2 «+» - положительный результат.

Как видно из данных таблицы 2, что титр патогенной активности свежего штамма «Т-53» ВБН на 45 сут. цыплятах составил $8,25 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$. При этом цыплята, зараженные разведениями вируса от 10^{-1} до 10^{-5} погибли на 6 сут., а остальные цыплята на 7 и 8 сут. У зараженных цыплят наблюдались признаки, характерные для болезни Ньюкасла, как вялость, угнетение, отказ от корма и воды, затем они через один день или два погибали (рис. А, Б). На 5 сутки после заражения у цыплят были взяты смывы из носовой полости и при исследовании которых в РГА установлено наличие гемагглютининов с активностью 1:8-1:32, что свидетельствовало о присутствии вируса в организме инфицированных цыплят. Цыплята, зараженные разведением вируса 10^{-9} , оставались живыми на протяжении всего срока наблюдения.



А - больные цыплята после заражения, Б – гибель цыплят на 6-8 сут. после заражения

Рисунок. Клиническая картина зараженных штаммом «Т-53» вируса болезни Ньюкасла цыплят

Обсуждение

В своей работе ученые коллекции микроорганизмов ежедневно сталкиваются с потребностью сохранять микроорганизмы в течение длительного времени. Основными целями хранения является поддержание штаммов возбудителей инфекционных заболеваний в высокоактивной форме и чистоте культур, а также предупреждение изменений их свойств и мутаций, т.е. сохранение микроорганизма в состоянии, максимально близком к исходному выделенному штамму [15]. В этом случае, процесс лиофилизирования позволяет в течение нескольких лет сохранять биологические свойства бактерий, вирусов таких как вирулентность, антигенность и культурально-биохимические свойства. Стабилизирует на длительное время иммуногенную активность живых микробов и вирусных вакцин, активных и специфичных диагностических сывороток, и антигенов, а также обеспечивает стандартность товарного вида препаратов и длительное сохранение их биологической активности [16-18].

Исследуемый штамм «Т-53» вируса болезни Ньюкасла выделен из патологических биоматериалов доставленных из Томилинской птицефабрики в Всесоюзном научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии МСХ СССР в 1991 год, который используется в качестве антигена входящих в набор препаратов на основе моноклональных антител для дифференциальной диагностики болезни Ньюкасла твердофазным иммуноферментным методом [19-20], а также используется в качестве контрольного штамма для определения напряженности иммунитета у вакцинированных птиц, при разработке вакцины против данной инфекции [21-22]. В связи с этим поддержание штамма «Т-53» вируса болезни Ньюкасла в высокоактивной форме является одним из основных задач коллекции. При хранении штамма вируса в лиофилизированном виде за 9 лет биологическая активность снизилась на $1,74 \lg \text{ЭИД}_{50}$. Как известно, на длительность сохранения штаммов микроорганизмов своих иммунобиологических свойств влияют такие факторы как агрегатное состояние биоматериала, температура их хранения, состав стабилизирующей среды и др. [23]. Испытанный нами штамм «Т-53» вируса болезни Ньюкасла был освежен и изготовлен в 2015 г. с добавлением защитной

среды, состоящей из обезжиренного молока КРС в соотношении с ВСС 1:1 и хранился при минус 40 °С, что позволило довольно хорошо сохранить основные биологические свойства штамма за период хранения. Результаты наших исследований по проверке патогенной активности штамма на цыплятах свидетельствуют о сохранении после освежения своих основных биологических характеристик.

Заключение

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что за 9 лет хранения активность штамм «Т-53» вируса болезни Ньюкасла снизилось на 1,74 lg, при исходной биологической активности – 8,44 lg ЭИД₅₀/мл. Трехкратное пассирование на РКЭ позволило восстановлению исходной активности штамма ((8,23 ± 0,17) lg ЭИД₅₀/мл с титром РГА 1:512), уровень которой позволяет длительному хранению без освежения;

2. При оценке патогенных свойств освеженного образца штамм «Т-53» вируса болезни Ньюкасла установлено, что титр составляет 8,25 lg ЛД₅₀. У инфицированных цыплят наблюдаются клинические признаки болезни, характерные для болезни Ньюкасла.

3. Освеженный штамм «Т-53» вируса болезни Ньюкасла соответствует параметрам, заложенным в паспорте штамма.

Благодарности: Авторы выражают благодарность Б.И. Бектурову за помощь в проведении научно-исследовательских работ.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Литература:

1. OIE, Office of International Epizootics, Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Newcastle disease // Truszczyński Eds. OIE standard commission publication, 2004 version, part 2, section 2.1 chapter 2.1.15.
2. Hines N. L., Miller C. L. Avian Paramyxovirus serotype-1: review of disease distribution, clinical symptoms and laboratory diagnostics // Veterinary medicine international volume .-2012.- 17 p. doi:10.1155/2012/708216
3. Ganar K., Das M., Sinha S., Kumaret S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding // Virus Research, 2014. – (184). – P. 71-81
4. Liu X.F., Wan H.Q., Wu Y.T. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during -1985–2001.//Arch Virol -2003.-148. – P. 1387-1403
5. Susta L., Miller P.J., Afonso C.L., Estevez C., Yu Q., Zhang J., Brown C.C. Pathogenicity evaluation of different Newcastle disease virus chimeras in 4-week-old chickens // Trop. Anim. Health Prod. – 2010. 42:1785–1795
6. Collins P.L., Hightower L.E., Ball L.A. Transcriptional map for Newcastle disease virus // J. Virol.- 1980. 35:682–693
7. Seal B.S., King D.J., Sellers H.S. The avian response to Newcastle disease virus // Dev. Comp. Immunol. - 2000. 24:257–268
8. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses // Rev Sci Tech., 2000 Aug;19(2):443-62. doi: 10.20506/rst.19.2.1231. PMID: 10935273.
9. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In Diseases of poultry, 10th Ed. / B.W. Calnek with H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif, eds // Mosby-Wolfe, London, 1997. - P. 541-570.
10. Болезнь Ньюкасла 2024 Merck & Co., Inc., Рахвей, Нью-Джерси, США, и ее подразделения [Электрон.ресурс]. - URL: <https://www.msd-animal-health-poultry.ru/disease/bolezni-nyukasla/>
11. Коровин Р.Н., Зеленский В.П., Грошева Г.А. Лабораторная диагностики болезней птиц // Москва «Агропромиздат». – 1989. – С. 17.
12. Reed, I.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [Text] / I.J. Reed // Am. J. Hyg., 1938. – Vol.27. – P. 493-497.
13. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. ГОСТ 28085-2013.
14. Методические указания по определению уровня антител к вирусу ньюкаслской болезни

в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) // Болезни птиц. – 1997. – № 13. – С. 448-453.

15. Шмыленко В.А., Бондаренко А.П. Методические подходы к решению проблемы сохранения прихотливых микроорганизмов // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии, 2018. — №34

16. Токарик Э.Ф., Ковальская Л.А., Скотникова Т.А. и др. Методические подходы к конструированию защитных сред для живых вирусных вакцин // Научные основы производства ветеринарных препаратов. – М., 1989. – С. 17-21.

17. Токарик Э.Ф., Ковальская Л.А., Константинов В.М. Методы статистического анализа в исследованиях по стабилизации вирусных вакцин. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины // Тезисы докл. Межд. конф. Харьков, 1988. – С. 56.

18. Глущенко А. В. Биологические свойства вирусов болезни Ньюкасла, выделенных из природных резервуаров среди диких птиц в различных регионах России в 2008-2018 гг./ Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук // А. В. Глущенко. – Владимир, 2022. – С. 87

19. Виткова О.Н. Сравнительное изучение чувствительности и специфичности иммуноферментного анализа с хемилюминисцентной и колориметрической детекцией для выявления антигенов и антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла. / О.Н. Виткова, О.В. Капустина, Т.П. Лобова и др. // Вопросы вирусологии, 2015. – 60 (6). – С.41-45.

20. Капустина О.В. Разработка и совершенствование средств и методов контроля особо опасных инфекций, вызываемых вирусами порядка *Mononegavirales* / Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук // О.В. Капустина. – Вольгинский, 2016. – С. 104-143.

21. Кенжебаева М.К., Матраимов М.Б., Мамбеталиев М. Получение термостабильного варианта вируса Ньюкаслской болезни и изучение его иммунобиологических свойств / Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана, Бишкек, 2016. - №3. – С.74-77.

22. Битов Н.Т., Мамадалиев С.М., Далбаев Н.К., Кыдырбаев Ж.К. Троицкий Е.Н. Изучение возможности получения и применения пылевидной вакцины против болезни Ньюкасла / НИСХИ., пгт. Гвардейский, 1998. - Биотехнология. Теория и практика. №1-2 (5-6) с. 31-33

23. Мұзарап Д.И., Табыс Ш.Т., Сәрсенқұлова Н.А., Кенжебаева М.К., Мамбеталиев М., Наханов А.К., Жугунисов К.Д., Эрганиш О. Освежение вирулентного штамма вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в культуре клеток и проверка патогенных свойств на целевых животных // Микробиология және вирусология, 2023. - №3 (42). - www.imv-journal.kz

References:

1. OIE, Office of International Epizootics, Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Newcastle disease // Trusczynski Eds. OIE standard commission publication, 2004 version, part 2, section 2.1 chapter 2.1.15.

2. Hines N. L., Miller C. L. Avian Paramyxovirus serotype-1: review of disease distribution, clinical symptoms and laboratory diagnostics // Veterinary medicine international volume .-2012.- 17 p. doi:10.1155/2012/708216

3. Ganar K., Das M., Sinha S., Kumaret S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding // Virus Research, 2014. – (184). – P. 71-81

4. Liu X.F, Wan H.Q, Wu Y.T. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during -1985–2001.//Arch Virol -2003.-148. – P. 1387-1403

5. Susta L., Miller P.J., Afonso C.L., Estevez C., Yu Q., Zhang J., Brown C.C. Pathogenicity evaluation of different Newcastle disease virus chimeras in 4-week-old chickens // Trop. Anim. Health Prod. – 2010. 42:1785–1795

6. Collins P.L., Hightower L.E., Ball L.A. Transcriptional map for Newcastle disease virus // J. Virol.- 1980. 35:682–693

7. Seal B.S., King D.J., Sellers H.S. The avian response to Newcastle disease virus // Dev. Comp. Immunol. - 2000. 24:257–268

8. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses // Rev Sci Tech., 2000 Aug;19(2):443-62. doi: 10.20506/rst.19.2.1231. PMID: 10935273.

9. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In Diseases of poultry, 10th Ed. / B.W. Calnek with H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif, eds //

Mosby-Wolfe, London, 1997. - P. 541-570.

10. Bolezn' N'yukasla 2024 Merck & Co., Inc., Rakhvey, N'yu-Dzhersi, SSHA, i yeye podrazdeleniya [Электрон.ресурс]. - URL: <https://www.msd-animal-health-poultry.ru/disease/bolezni-nyukasla/>

11. Korovin R.N., Zelenskiy V.P., Grosheva G.A. Laboratornaya diagnostiki bolezney ptits // Moskva «Agropromizdat». – 1989. – S. 17.

12. Reed, I.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [Text] / I.J. Reed // Am. J. Hyd., 1938. – Vol.27. – P. 493-497.

13. Sredstva lekarstvennyye biologicheskiye dlya veterinarnogo primeneniya. GOST 28085-2013.

14. Metodicheskiye ukazaniya po opredeleniyu urovnya antitel k virusu n'yukaslskoy bolezni v reaktsii tormozheniya gemagglutinatsii (RTGA) // Bolezni ptits. – 1997. – № 13. – S. 448-453.

15. Shmylenko V.A., Bondarenko A.P. Metodicheskiye podkhody k resheniyu problemy sokhraneniya prikhodivnykh mikroorganizmov // Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy Patologii, 2018. — №34

16. Tokarik E.F., Koval'skaya L.A., Skotnikova T.A. i dr. Metodicheskiye podkhody k konstruirovaniyu zashchitnykh sred dlya zhivnykh virusnykh vaktsin // Nauchnyye osnovy proizvodstva veterinarnykh preparatov. – M., 1989. – S. 17-21.

17. Tokarik E.F., Koval'skaya L.A., Konstantinov V.M. Metody statisticheskogo analiza v issledovaniyakh po stabilizatsii virusnykh vaktsin. Dostizheniya i perspektivy razvitiya kriobiologii i kriomeditsiny // Tezisy dokl. Mezhd. konf. Khar'kov, 1988. – S. 56.

18. Glushchenko A. V. Biologicheskiye svoystva virusov bolezni N'yukasla, vydelennykh iz prirodnykh rezervuarov sredi dikikh ptits v razlichnykh regionakh Rossii v 2008-2018 gg./ Dissertatsiya na soiskaniye uchenoy stepeni kandidata biologicheskikh nauk // A. V. Glushchenko. – Vladimir, 2022. – S. 87

19. Vitkova O.N. Sravnitel'noye izucheniye chuvstvitel'nosti i spetsifichnosti immunofermentnogo analiza s khemilyuminiscentnoy i kolorimetricheskoy detektsiyey dlya vyyavleniya antigenov i antitel k virusam grippa ptits i bolezni N'yukasla. / O.N. Vitkova, O.V. Kapustina, T.P. Lobova i dr. // Voprosy virusologii, 2015. – 60 (6). – S.41-45.

20. Kapustina O.V. Razrabotka i sovershenstvovaniye sredstv i metodov kontrolya osobo opasnykh infektsiy, vyzyvayemykh virusami poryadka Mononegavirales / Dissertatsiya na soiskaniye uchenoy stepeni doktora veterinarnykh nauk // O.V. Kapustina. – Vol'ginskiy, 2016. – S. 104-143.

21. Kenzhebayeva M.K., Matraimov M.B., Mambetaliyev M. Polucheniye termostabil'nogo varianta virusa N'yukaslskoy bolezni i izucheniye yego immunobiologicheskikh svoystv / Nauka, novyye tekhnologii i innovatsii Kyrgyzstana, Bishkek, 2016. - №3. – S.74-77.

22. Bitov N.T., Mamadaliyev S.M., Dalbayev N.K., Kydyrbayev ZH.K. Troitskiy Ye.N. Izucheniye vozmozhnosti polucheniya i primeneniya pylevidnoy vaktsiny protiv bolezni N'yukasla / NISKHI., pg. Gvardeyskiy, 1998. - Biotehnologiya. Teoriya i praktika. №1-2 (5-6) s. 31-33

23. Mūzarap D.I., Tabys SH.T., Sərsenkūlova N.A., Kenzhebayeva M.K., Mambetaliyev M., Nakhanov A.K., Zhugunisov K.D., Erganish O. Osvezheniye virulentnogo shtamma virusa paragripa-3 krupnogo rogatogo skota v kul'ture kletok i proverka patogennykh svoystv na tselevykh zhivotnykh // Mikrobiologiya zhəne virusologiya, 2023. - №3 (42). - www.imv-journal.kz

НЬЮКАСЛ АУРУЫНЫҢ ВИРУЛЕНТТІ ШТАМЫН ТАУЫҚ ЭМБРИОНЫНДА ЖАҢАРТУ ЖӘНЕ ОНЫҢ ПАТОГЕНДІ ҚАСИЕТІН БАЛАПАНДАРДА ТЕКСЕРУ

**С.С. Килибаев *, М.К. Кенжебаева , М. Мамбеталиев , М.А. Азанбекова ,
А.Д. Валиева , Н.А. Сарсенкулова , М.С. Туысканова , Д.И. Музарap , Ш.Т.
Табыс , Б.Б. Кадырова , А.А. Ашимова , К.Д. Жугунисов **

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
Гвардейский қтк, Қазақстан

*s.kilibayev@biosafety.kz

Аннотация. Бастапқы зерттеуден бастап, әртүрлі биологиялық өнімдерді өндіріске қолдануға дейін, штамдарды жұмыс жағдайында ұстау және олардың құнды қасиеттерін сақтау микроорганизмдермен кез келген дерлік жұмыстың маңызды шарты болып табылады. Осыған байланысты, бұл мақалада дамып кележатқан тауық эмбриондарында (ДТЭ) Ньюкасла ауруы вирусы (НАВ) сияқты жұқпалы аурулардың қоздырғыш штаммын жаңарту және оның патогендік белсенділігін балапандарда анықтау бойынша зерттеу нәтижелері берілген.

9 жыл сақтау кезінде НАВ-ның Т-53 штаммының биологиялық белсенділігі 1,74 lg ЭИД₅₀/мл дейін төмендеді. ДТЭ-да қатарынан үш рет пассаждау нәтижесінде штамның биологиялық белсенділігі ұзақ сақтауға мүмкіндік беретін қолайлы деңгейге дейін өсті. Содан кейін алынған вирусы бар суспензия (ВБС) штамның паспорттық деректеріне сәйкес қорғаныш ортаны қосу арқылы лиофилизацияланады. Лиофильді кептірілген штамның сапасы келесі негізгі көрсеткіштері: сыртқы түрі, бөгде қоспалардың болмауы, ампулалардың көгеруі және жарықтары, вакуумның болуы, ерігіштігі, сутегі иондарының концентрациясы, ылғалдың массалық үлесі, бактериялық, саңырауқұлақ және микоплазмалық ластаушылардан тазалығы, биологиялық және патогендік белсенділігі бойынша бағаланды.

Тексеру барысында НАВ-ның Т-53 штаммының жаңартылған үлгісі физика-химиялық және биологиялық қасиеттері штамм паспортындағы деректерге сәйкестігін көрсетті.

Негізгі сөздер: вирус, штамм, Ньюкасла ауруы, патогенділік, жаңарту, қорғаныс ортасы, лиофилизация.

REFRESHMENT OF A VIRULENTIC STRAIN OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS IN CHICKEN EMBRYOS AND TESTING ITS PATHOGENIC PROPERTIES ON CHICKENS

S.S. Kilibaev^{id}, M.K. Kenzhebaeva^{id}, M. Mambetaliev^{id}, M.A. Azanbekova^{id}, A.D. Valieva^{id}, N.A. Sarsenkulova^{id}, M.S. Tuyskanova^{id}, D.I. Muzarap^{id}, Sh.T. Tabys^{id}, B.B. Kadyrova^{id}, A.A. Ashimova^{id}, K.D. Zhugunisov^{id}

«Scientific Research Institute of Biological Safety Problems» LLP, Gvardeysky, Kazakhstan

*s.kilibayev@biosafety.kz

Abstract. The preservation of strain viability and maintenance of their valuable properties are critical prerequisites for all stages of microorganism research, ranging from initial characterization to their application in the production of various biopreparations. This study investigates the revitalization of the virulent Newcastle disease virus (NDV) strain "T-53" in developing chicken embryos (DCE) and evaluates its pathogenic activity in chicks.

After nine years of storage, the biological activity of the "T-53" NDV strain declined to 1.74 lg EID₅₀/ml. Following three successive passages in DCE, the biological activity of the strain was restored to a level suitable for long-term storage. The virus-containing suspension produced was subsequently lyophilized with the addition of a protective medium in accordance with the strain's passport specifications. The quality of the lyophilized strain was evaluated using several key parameters, including appearance, absence of foreign impurities, mold, and ampoule cracks, presence of vacuum, solubility, pH value, moisture content, sterility against bacterial, fungal, and mycoplasmal contaminants, biological activity, and pathogenicity.

The findings confirmed that the physicochemical and biological properties of the revitalized "T-53" NDV strain correspond to the specifications outlined in its passport, ensuring its suitability for further use and long-term preservation.

Keywords: virus, strain, Newcastle disease, pathogenicity, refreshment, protective environment, lyophilization.