

УДК 619:578.832.1

**ОТРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ H5N2
НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ
WORKING OFF PARAMETERS OF POULTRY FLUE H5N2 VIRUS CULTIVATION ON
POULTRY EMBRYOS**

**Ю.Н. Минчук
U.N. Mintchuk**

**РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»
RUE “Institute of experimental veterinary named after S.N. Vyshellessky”**

As a result of research conducted it was determined that low concentration and GAA of poultry flue H5N2 was noticed at infection of 9-day KE in chorion-allantoic membrane in the amount of 100 Ig EID_{50/0,2ml} with further cultivation within 72 hours. Keeping these parameters we obtain maximum possible volume of virus containing material with IT 7,0-7,5 Ig EID_{50/ml} and GAA 6-8 log_g.

Среди вирусов, способных вызвать эпизоотические ситуации, борьба с которыми на этапе их возникновения трудна или вообще невозможна, особенно опасны вирусы гриппа. В последнее десятилетие во многих странах мира зарегистрированы эпизоотические вспышки данного заболевания среди птиц. Для того чтобы защитить поголовье в промышленном птицеводстве существует система мер по соблюдению биологической безопасности. Кроме этого при угрозе возникновения болезни важным средством борьбы является вакцинопрофилактика [1-9].

Для получения высокоэффективного препарата необходим подтип вируса, гомологичный циркулирующему подтипу по гемагглютину, обладающий способностью к накоплению в высоких титрах в биологическом материале, а также высокой гемагглютинирующей активностью (ГАА). Перед нами была поставлена задача установить оптимальные параметры культивирования вируса гриппа птиц (ВГП) H5N2 с инфекционным титром (ИТ) 7,0 Ig ЭИД_{50/мл} и ГАА 8 log₂ в КЭ для его накопления и последующего изготовления на его основе инактивированной вакцины.

Большинство исследователей для культивирования вируса гриппа птиц используют 9-11 суточные куриные эмбрионы (КЭ). Согласно литературным данным, максимальное накопление вируса в КЭ происходит в течение 48–96 часов в аллантаической и амниотической жидкости при заражении дозой 100-1000 Ig ЭИД_{50/0,2мл}. Поэтому при проведении исследования учитывали следующие показатели: возраст КЭ – 9, 10 и 11 суток; доза заражения КЭ – 100 Ig ЭИД_{50/0,2мл} и 1000 Ig ЭИД_{50/0,2мл}; время культивирования – 48, 72, 96 часов.

КЭ 9-, 10- и 11-ти суточного возраста заражали ВГП H5N2. В хорион-аллантаическую оболочку инокулировали по 0,2 мл вирусосодержащего материала в дозах 100 Ig ЭИД_{50/0,2мл} и 1000 Ig ЭИД_{50/0,2мл}. Использовали по 12 КЭ каждого возраста для заражения вышеуказанными дозами. Культивировали в условиях инкубатора при температуре +37,0°C и относительной влажности 60%, проводя овоскопирование 1 раз в сутки. Наибольшая концентрация вируса и его ГАА наблюдается в период гибели эмбрионов. Поэтому при овоскопировании отбирали умерших КЭ и помещали их в холод. Гибель в течение первых 24 часов считали неспецифической. В последующем через 48, 72 и 96 часов из инкубатора отбирали по 4 КЭ всех возрастов, зараженных 100 Ig ЭИД_{50/0,2мл} и 1000 Ig ЭИД_{50/0,2мл}, охлаждали при температуре +6°C в течение 12-24 часов и вскрывали. Экстраэмбриональную жидкость от каждого КЭ проверяли в капельной реакции гемагглютинации (РГА) на стекле с 1%-й взвесью эритроцитов петуха на наличие

гемагглютинирующего вируса. Если РГА была положительной, то жидкости от каждой группы эмбрионов стерильно отбирали в отдельные флаконы. В полученном таким образом вирусосодержащем материале определяли гемагглютинирующую и инфекционную активность. ГАА вируса проверяли постановкой РГА в иммунологических планшетах с U-образным дном. Для исследования ИТ заражали 9-суточных КЭ десятикратными разведениями вируса. На каждое разведение использовали по 4 КЭ, вводя по 0,2 мл вирусосодержащего материала в хорион-аллантаоисную оболочку. Инкубировали 96 часов при температуре +37,0°C и влажности 60% в условиях инкубатора. Гибель КЭ в течение первых 24 часов считали неспецифической и при определении ИТ вируса не учитывали. По истечении срока инкубации эмбрионы охлаждали и вскрывали. Определяли наличие вируса в экстраэмбриональной жидкости с помощью капельной РГА на стекле с 1%-й взвесью эритроцитов петуха. ЭИД₅₀ рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина.

В результате проведенного исследования было установлено, что наибольшая концентрация и ГАА вируса гриппа птиц H5N2 наблюдается при заражении им 9-суточных КЭ в хорион-аллантаоисную оболочку в дозе 100 Ig ЭИД_{50/0,2мл}, при дальнейшем культивировании в течение 72 часов. Соблюдая данные параметры, мы получаем максимально возможный объем вирусосодержащего материала с ИТ 7,0-7,5 Ig ЭИД_{50/мл} и ГАА 6-8 log₂.

Литература

1. Грипп и другие вирусные инфекции птиц / В. А. Бакулин [и др.] ; Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ветеринар. ин-т птицеводства, Рос. акад. мед. наук, ГУ Науч.-исслед. ин-т гриппа. - Санкт-Петербург, 2005. - 74 с. : ил.
2. Макаров, В. В. Высокопатогенный грипп птиц / В. В. Макаров // Ветеринария в птицеводстве. – 2004. - № 1. – С. 47-48.
3. Испытание вакцины против высокопатогенного гриппа птиц в эксперименте / Э. Д. Джавадов [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2006. - N 3. – С. 40-41
4. Domanska-Blicharz, K. Molecular methods for the detection of avian influenza type A viruses / K. Domanska-Blicharz, K. Smietanka, Z. Minta // Bull. Veter. Inst. in Pulawy. – 2006. – Vol. 50, № 3. – P. 287-291.
5. Brugh, M. Pathogenicity of three avian influenza viruses for Leghorn hens of different ages / M. Brugh // Avian Dis. – 1996. – Vol. 40, № 3. – P. 725-728.
6. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowl-pox-H5 recombinant / R. G. Webster [et al.] // Avian Dis. – 1996. – Vol. 40, N 2. – P. 461-465.
7. Лагуткин, Н. Грипп птиц / Н. Лагуткин // Птицеводство. – 1997. - № 1. – С. 22-23.
8. Swayne, D. E. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens / D. E. Swayne // Veter. Pathol. – 1997. – Vol. 34, N 6. – P. 557-567.
9. Experimental assessment of the pathogenicity of two avian influenza A H5 viruses in ostrich chicks (*Struthio camelus*) and chickens / R. J. Manvell [et al.] // Avian Pathol. – 1998. – Vol. 27, N 4. – P. 400-404.