
БИОЛОГИЯ

МРНТИ: 571.27:615.37. 578.831.11

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ИНАКТИВАЦИИ
ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА**

¹Мырзахметов Елдос Туребаевич

М.Н.С.

²Сазыкулова Гульбайра Джолдошбековна

К. б. н., доцент

¹Асанжанова Нурика Нарынбековна,

кандидат медицинских наук

¹Кыдырбаев Жайлаубай

кандидат ветеринарных наук, профессор

¹Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна

магистр биологических наук

¹Кожамкулов Еркен Муратханович

магистр биологических наук

¹Майлыбаева Айгерим Мухаметалиевна

магистр ветеринарных наук

¹Сагимбаева Айгерим Манасовна

магистр технических наук

¹Акмырзаев Нурлан Жарылкасынулы

магистр ветеринарных наук

**НЬЮКАСЛ ООРУСУНУН ВИРУСУНУН ИНАКТИВАЦИЯСЫНЫН
ПАРАМЕТРЛЕРИН ОПТИМАЛДАШТЫРУУ**

Мырзахметов Елдос Туребаевич

кенже илимий кызматкер

Сазыкулова Гульбайра Джолдошбековна

биология илимдеринин кандидаты, доцент

Асанжанова Нурика Нарынбековна,

медицина илимдеринин кандидаты

Кыдырбаев Жайлаубай

ветеринария илимдеринин кандидаты, профессор

Рыскельдинова Шолпан Жанбырбаевна

биология илимдеринин магистри

Кожамкулов Еркен Муратханович

биология илимдеринин магистри

Майлыбаева Айгерим Мухаметалиевна

ветеринария илимдеринин магистри

Сагимбаева Айгерим Манасовна
техника илимдеринин магистри
Акмырзаев Нурлан Жарылкасынулы
ветеринария илимдеринин магистри

OPTIMIZATION OF INACTIVATION PARAMETERS NEWCASTLE DISEASE VIRUS

Myrzakhmetov Yeldos Turebaevich
junior research assistant
Sazykulova Gulbaira Djoldoshbekovna
candidate of biological sciences, docent
Assanzhanova Nurika Narynbekovna
candidate of medical sciences
Kydyrbaev Zhailaubay
candidate of veterinary sciences, professor
Ryskeldinova Sholpan Zhanbyrbaevna
master of biological sciences
Kozhamkulov Erken Muratkhanovich
master of biological sciences
Mailybayeva Aigerim Mukhametalievna
master of veterinary sciences
Sagymbayeva Aigerim Manasovna
master of technical sciences
Akmyrzayev Nurlan Zharylkhasynuly
master of veterinary sciences

¹Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК, 080409, пгт. Гвардейский, Жамбылская обл., Казахстан

²Кыргызский государственный университет им. И. Арабаева

Аннотация. В данной статье представлены результаты сравнительного анализа инактивации вируса болезни Ньюкасла формальдегидом, димером этиленимина и β -пропиолактоном. В ходе исследования установлено, что формальдегид является наиболее эффективным инактивантом для вируса болезни Ньюкасла по сравнению с другими инактивантами. Формальдегид, в конечной концентрации 0,05%, полностью теряет свою инфекционную активность в течение 14 ч. при определенных условиях обработки. Эти условия включают поддержание температуры около $37 \pm 0,5$ °C и поддержание pH реакционной среды в диапазоне от 7,2 до 7,6.

Ключевые слова: вирус болезни Ньюкасла, инактивация, β -пропиолактон, формальдегид, димер этиленимина.

Аннотация. Бул макалада формальдегид, этиленимдин димер жана β -пропиолактон аркылуу Ньюкасл оорусунун вирусун инактивациялоону салыштырып изилдөөнүн натыйжалары берилген. Изилдөө формальдегид башка инактиванттарга салыштырмалуу Ньюкасл оорусунун вирусу үчүн эң эффективдүү инактиватор экени аныкталган. Формальдегид, 0,05% акыркы концентрациясында, белгилүү бир

иштетүү шарттарында 14 сааттын ичинде инфекциялык активдүүлүгүн толугу менен жоготот. Бул шарттарга $37 \pm 0,5$ °C тегерегинде температураны сактоо жана 7,2 7,6 диапазонунда реакция чөйрөнүн рН сактоо кирет.

Негизги сөздөр: Ньюкасл оорусунун вирусы, инактивация, формальдегид, этиленмин димер, β -пропиолактон.

Abstract. This article presents the results of a comparative study of the inactivation of the Newcastle disease virus by formaldehyde, ethylenimine dimer and β -propiolactone. The study found that formaldehyde is the most effective inactivant for the Newcastle disease virus compared to other inactivants. Formaldehyde, at a final concentration of 0.05%, completely loses its infectious activity within 14 hours under certain processing conditions. These conditions include maintaining the temperature around 37 ± 0.5 °C and maintaining the pH of the reaction medium in the range of 7.2 to 7.6.

Key words: Newcastle disease virus, inactivation, β -propiolactone, formaldehyde, dimerethylenimine.

Введение

Болезнь Ньюкасла (БН) – высоко контагиозное инфекционное заболевание кур и других домашних и диких птиц. Она является проблемой не только безопасности пищевых продуктов, это мировая проблема, способная вызывать разрушительное заболевание у домашних птиц с огромными социальными и экономическими последствиями. Болезнь Ньюкасла проявляется как острое респираторное заболевание с преобладающей клинической формой депрессии, нервных расстройств или диареи [1].

Согласно данным МЭБ в последние годы вспышки БН были отмечены в разных странах, в том числе в промышленно развитых. Так, в 2022 году болезнь зарегистрирована в Израиле, Боливии, России, Румынии, Турции и Швейцарии, в 2023 году в Польше [2, 3]. В том числе и в Казахстане эпизоотическая ситуация по БН остаётся напряжённой: каждый год регистрируются новые очаги заболевания, болезнь регистрируется как в ранее неблагополучных пунктах, так и в новых. Согласно официальным данным министерства сельского хозяйства Республики Казахстан (МСХ РК), в 2018-2023 гг. болезнь зарегистрирована в Северо-Казахстанской, Карагандинской областях [4, 5]. Сохраняется постоянная угроза за-

носа вируса на территорию страны перелетными птицами.

Основным методом борьбы с БН считается вакцинация. В настоящее время в разных странах разработаны технологии приготовления и применения живых и инактивированных вакцин против болезни Ньюкасла [6-9]. Согласно научным данным [10], на многих птицефабриках применение живых вакцин чередуется с использованием инактивированных вакцин для достижения максимальной эффективности в борьбе с возбудителями заболеваний.

На сегодняшний день в Казахстане разработаны и применяются технологии изготовления живых вакцин против болезни Ньюкасла из штаммов «Ла-Сота», «Н», «Бор-74 ВГНКИ» [11, 12], а технология изготовления инактивированных вакцин против данной болезни птиц до сих пор остается на этапе разработки.

Важным условием разработки эффективных инактивированных вакцин является количество и качество вирусного антигена, выбор инактиванта и оптимальных условий инактивации, позволяющих полностью лишить вирулентности вируса при максимальном сохранении его антигенной активности. Способы инактивации вируса оказывают решающее влияние на иммуногенность вакцины.

Таким образом, поиск и использование надежных методов инактивации являются ключевым аспектом в разработке инактивированных вакцин. Исходя из этого, целью данной работы является определение оптимального условия для инактивации вирусного антигена для получения эффективной инактивированной вакцины против болезни Ньюкасла.

Материалы и методы

Вирус

Объектом исследования были штаммы «Ла-Сота» и «Н» вируса болезни Ньюкасла, с исходными инфекционными активностями $9,70 \pm 0,14 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и $8,95 \pm 0,14 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно, выращенных культивированием в 10-12 суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

Культивирование вируса болезни Ньюкасла в РКЭ

Культивирование вирусного материала осуществлялось в 10-12 суточных РКЭ. Титр вируса определялся с использованием метода Рида-Менча и выражался в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ [13]. Для определения наличия гемагглютининов использовался микрометод реакции гемагглютинации (РГА) с применением 1 % эритроцитов петуха [14].

Выбор эффективного инактиванта и определение оптимального регламента инактивации вируса БН

По результатам анализа литературы, нами в качестве наиболее перспективных и эффективных инактивантов для штаммов «Ла-Сота» и «Н» вируса БН выбраны формальдегид (Ф) [15], димер этиленмина (ДЭИ) [16] и β -пропиолактон (БПЛ) [15]. Каждый из этих инактивантов имеет свои преимущества и может использоваться при инактивации вируса БН в зависимости от требуемых целей исследования или применения.

Согласно доступным литературным данным, были выбраны следующие действующие концентрации: 0,05 % и 0,1 %

для Ф, 0,2 %, 0,3 % и 0,4 % ДЭИ, а также 0,025 % и 0,05 % БПЛ.

Во время инактивации пробы перемешивались каждые 2 часа в течение всего периода инактивации, и для нейтрализации действия инактиванта в каждую пробу добавляли тиосульфат натрия до конечной концентрации 0,25 %. Определение остаточной инфекционной активности вируса проводилось с использованием [13].

Оценка антигенных свойств инактивированного вируса.

Для проведения иммунизации птиц была использована полностью инактивированная вирусная суспензия ВБН. После однократной иммунизации, через 16 сут., у цыплят была отобрана кровь для определения уровня накопления антигенов в РТГА [17].

Контроль авирулентности на РКЭ

Для оценки наличия остаточной вирулентности заражали эмбрионы (объемом $0,2 \text{ см}^3$) инактивированной суспензией, с последующим инкубированием в течение 72 ч., и в аллантоисной жидкости после каждого пассажа определяли наличие гемагглютининов в РГА [17].

Результаты и обсуждение

Инактивация вирусов в процессе производства вакцин является важным этапом, который обеспечивает безопасность и эффективность вакцины. При определении параметров инактивации необходимо обратить внимание на такие ключевые факторы, как температура, продолжительность инактивации, pH реакционной среды и концентрация инактиванта.

Инактивация вируса БН формальдегидом

Для определения оптимального времени инактивации штаммов «Ла-Сота» и «Н» вируса БН растворами формальдегида с действующими концентрациями 0,05 % и 0,1 % при температуре $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ был проведен ряд экспериментов, результаты которых представлены на рисунке 1.

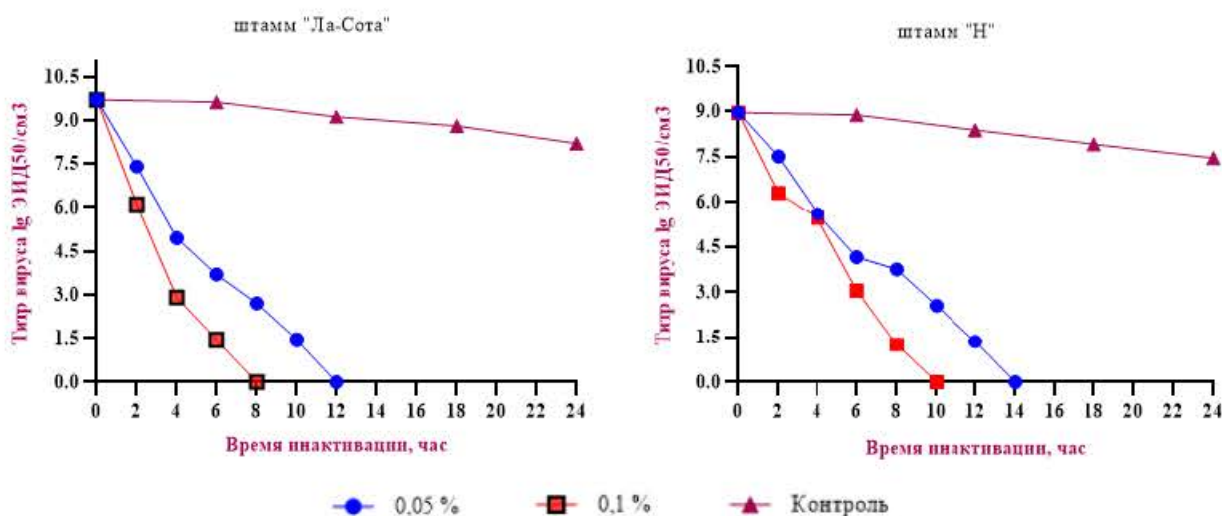


Рис. 1. Кинетика вируса БН с формальдегидом в зависимости от времени инактивации

Результаты представленные на рис. 1, указывают, что вирус БН, присутствующий в штаммах «Ла-Сота» и «Н», полностью теряет свою инфекционную активность при обработке формальдегидом в концентрации 0,05% через 14 ч., а при 0,1% через 8 ч. при одинаковых условиях реакционной среды, достигающей 37 °С. Результаты показали, что оптимальными параметрами инактивации формальдегидом штаммов «Ла-Сота» и «Н» считается конечная концентрация 0,05 % инактиванта при рН реакционной

среды 7,2-7,6. При данных условиях потеря инфекционной активности вируса происходила через 14 ч., при этом гемагглютинирующая активность вируса на протяжении всего периода оставалась на исходном уровне.

Инактивация вируса БН димер этиленгликолем

В дальнейших исследованиях для инактивации вирус БН использовали ДЭИ в его конечных концентрациях 0,2 %, 0,3 % и 0,4 % при температуре 37 ± 0,5 °С (рис. 2).

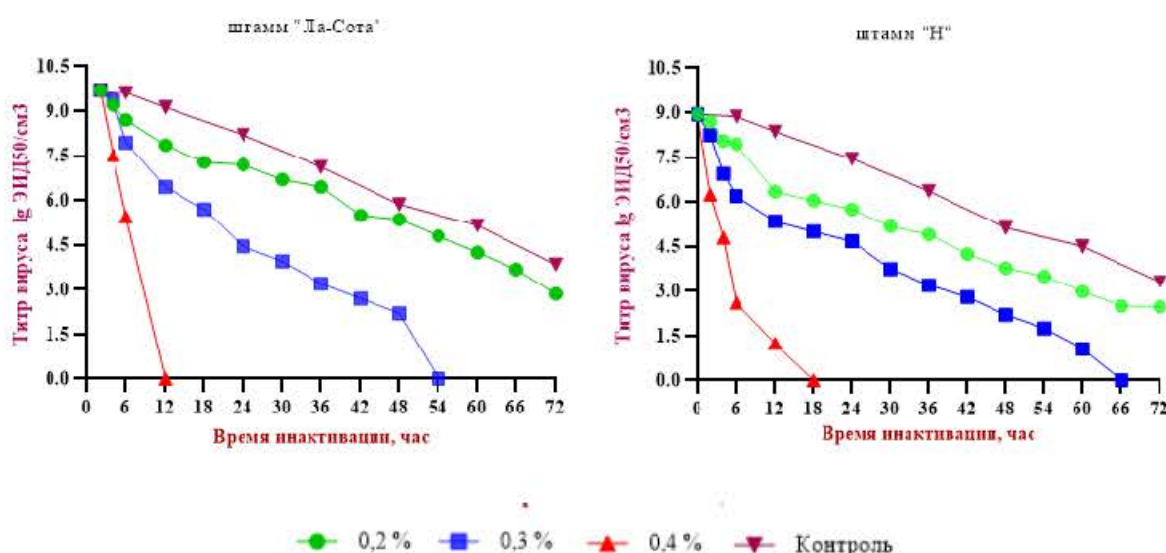


Рис. 2. Кинетика инактивации вируса БН с ДЭИ в зависимости от времени инактивации

Исследование, проведенное с использованием димера этиленimina, показало, что константа скорости инактивации вируса БН значительно зависит от его концентрации. Так, при концентрации 0,3 % скорость инактивации по штамму «Н» составила 66 ч., а штамма «Ла-Сота» - 54 ч. Приравнительно высокой концентрации - 0,4 %, время, необходимое для инактивации, сократилось до 18 и 12 часов.

Однако, при концентрации 0,2 % вирус БН не инактивировался даже после 72 часов. Эти результаты свидетельствуют о важности правильного подбо-

ра концентрации димера этиленimina при борьбе с данным вирусом. Исходя из вышеперечисленных результатов оптимальными по времени инактивации штаммов «Ла-Сота» и «Н» ДЭИ считается конечная концентрация 0,4 % ДЭИ при рН реакционной среды 7,2-7,6, при котором потеря инфекционной активности вируса происходит через 18 и 12 часов, сохраняя свою гемагглютинирующую активность на исходном уровне.

Инактивация вируса БН β -пропиолактоном

Далее определяли инактивирующее действие БПЛ на вирус БН в конечных концентрациях 0,025 % и 0,05 % (рис. 3).

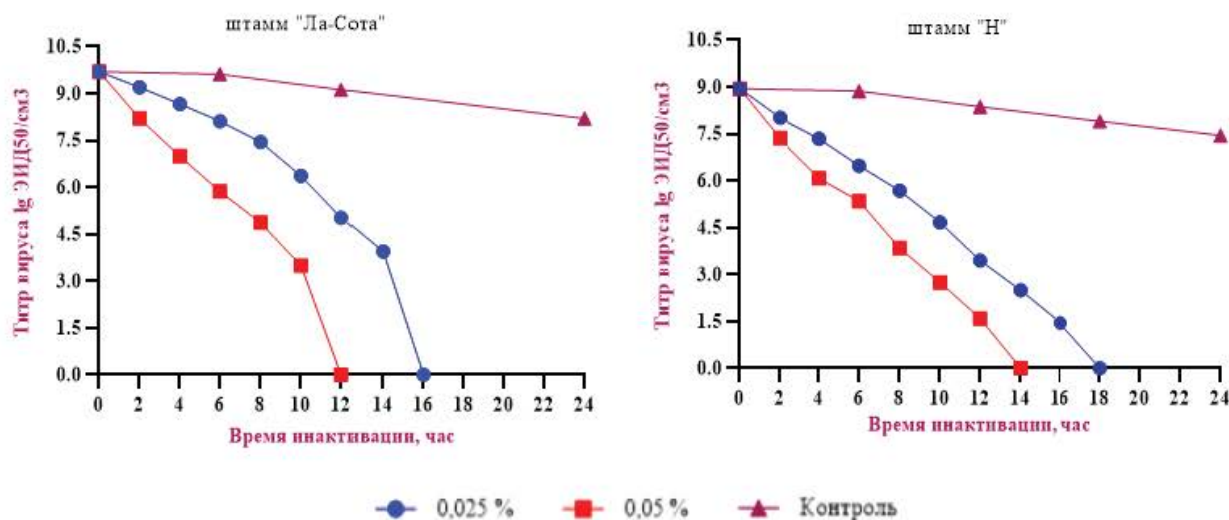


Рис. 3. Кинетика инактивации вируса БН с БПЛ в зависимости от времени инактивации

Согласно результатам исследования (рисунок 3), полная потеря инфекционной активности вируса БН штаммов «Ла-Сота» и «Н» при использовании БПЛ в конечных концентрациях 0,025 % и 0,05 % происходит через 18 и 12 ч., соответственно, активность на протяжении всего периода остается на исходном уровне. Оптимальными параметрами инактивации штаммов «Ла-Сота» и «Н»

БПЛ считается конечная концентрация инактиванта 0,025 %.

Морфология и антигенная активность вируса БН

Пробы, содержащие нативные и инактивированные оптимальные растворы Ф (0,05%), а также ДЭИ (0,4%) и БПЛ (0,025%) биоматериалы были подвергнуты электронно-микроскопическому анализу, результаты которых представлены на рисунке 4.

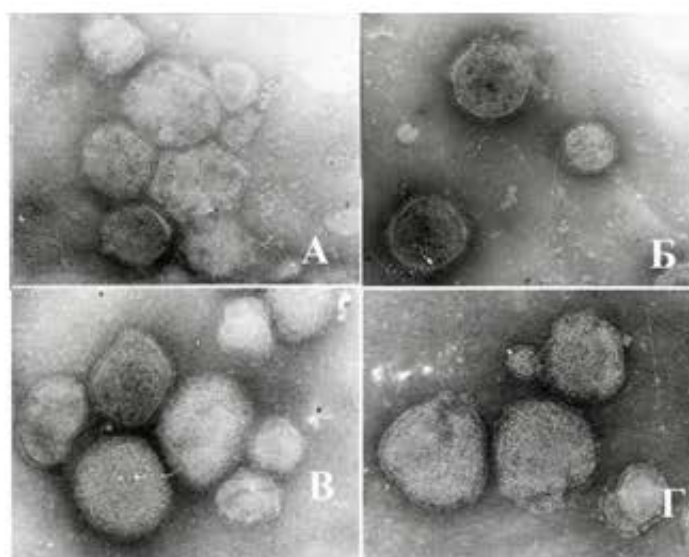


Рис. 4. Вирусы болезни Ньюкасла (электронная микроскопия).
Увеличение $\times 100\ 000$.

(А – нативный материал; Б – инактивированный 0,05 % Ф;
В – инактивированный 0,025 % БПЛ; Г – инактивированный 0,4 % ДЭИ)

Образцы вирусов, представленные на рисунке 4, показали, что все указанные инактивированные биоматериалы сохраняют свои структурные целостности и антигенные свойства одинаково с нативным образцом, при этом оптимально инактивируются и обезвреживаются вирусы БН.

Оценка антигенных свойств инактивированного вируса

В ходе исследования была проведена оценка антигенной активности инактивированной вирусной суспензии БН у однократно привитых цыплят через 16 сут. после иммунизации. Для этого мы отобрали сыворотку крови и определили уровень накопления антител в РТГА. Полученные результаты представлены на рис. 5.

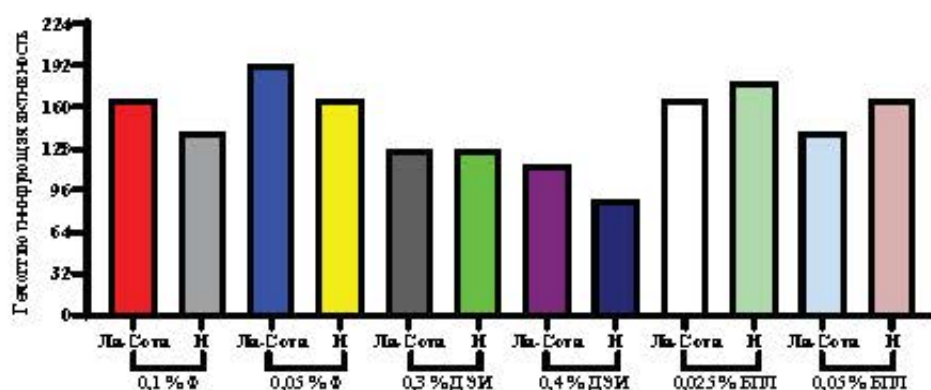


Рис. 5. Уровень накопления антител в РТГА у привитых цыплят через 16 сут.

Представленные данные на рис. 5 показывают, что после введения инактивированной вирусной суспензий БН при разных концентрациях инактиваторов у привитых птиц на 16 сут. было обнаружено наличие антител к вирусу БН в сыворотках крови со среднегеометрическим титром (СГТ), $\geq 1:89$ в РТГА. Это свидетельствует о том, что исследуемые инактивированные суспензии являются антигенно активными, которые согласуются с данными [18].

Контроль авирулентности на РКЭ

При оценке наличия остаточной вирулентности, все зараженные РКЭ после третьего пассажа оставались здоровыми и неизменными. Кроме того, в аллантоисной жидкости РКЭ не обнаруживались гемагглютинирующие элементы. При сравнении с аналогичными исследованиями [7], результаты показывают, что исследуемые образцы авирулентны и не уступают по эффективности.

По проведенному анализу данных выяснилось, что инактивация при присутствии Ф происходит раньше на 40 - 52 ч., чем с ДЭИ. А в свою очередь, сравнение Ф с БПЛ показало, что разница во времени их инактивирующих свойств незначительна, тем не менее, Ф является легко доступным и относительно дешевым вариантом по сравнению с другими инактивантами.

Согласно научным источникам, Ф считается широко распространенным веществом, эффективно применяемым для инактивации вирусов. Его механизм действия заключается в его химической реакции с белками и нуклеиновыми кис-

лотами, что приводит к полной нейтрализации и инактивации вирусов. Таким образом, использование формальдегида в качестве инактиванта представляет собой особый интерес [19, 20].

Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что для инактивации вируса БН из штаммов «Ла-Сота» и «Н» и в дальнейшем их использовании при производстве вакцин оптимальным инактивантом считается формальдегид в конечной концентрации 0,05 %, который полностью теряет свою инфекционную активность в течение 14 ч., при поддержании температуры около $37 \pm 0,5$ °С и поддержании pH реакционной среды в диапазоне от 7,2 до 7,6.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам лабораторий «Профилактика инфекционных болезней» и «Молекулярная биология и геновая инженерия» за оказанную помощь при выполнении научно-исследовательской работы по теме статьи.

Финансирование

Работа выполнена в рамках НТП «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации». В НИИПББ был реализован проект по разработке и внедрению инактивированной вакцины против болезни Ньюкасла и инактивированной ассоциированной вакцины против болезни Ньюкасла и гриппа птиц.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература:

1. OIE. Weekly Disease Information. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI
2. Официальные данные Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) Ветеринария и жизнь 2022 <https://vetandlife.ru/sobytiya/vspyshku-bolezni-njukasla-zaregistririvali-v-shvejcarii/>

3. Официальные данные Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) Ветеринария и жизнь 2023 <https://vetandlife.ru/sobytiya/na-polskih-pticefabrikah-zaregistrovannabolezn-njukasla/>
4. Официальные данные министерства сельского хозяйства Республики Казахстан <https://agronews.com/kz/ru/news/breaking-news/2023-11-01/53072>
5. Карантин из-за вспышки болезни Ньюкасла; 2023. Available at: <https://eldala.kz/novosti/zhivotnovodstvo/16266-bolezn-nyukasla-sredi-pticy-vuyavlena-v-karagandinskoy-oblasti>
6. Фролов С.В., Мороз Н.В., Чвала И.А., Ирза В.Н. Эффективность вакцин против Ньюкаслской болезни производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» в отношении актуальных вирусов VII генотипа // Ветеринария сегодня. – 2021. - №1. – С. 36-51
7. Jing Zh., Huiming Y., Hongjun X., Zengbin Ma & Guozhong Zhang // Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 avian influenza // National Library of Medicine. – 2017 - №14. – P. 56
8. Садовников Н.В., Кондратьев Р.Б. Биологическая оценка качества промышленной вакцины против болезни Ньюкасла // Аграрный вестник Урала. – 2010. – №1. – С. 58-60
9. Кондратьев Р.Б. Иммуногенность промышленной вакцины против болезни Ньюкасла // Ветеринария Кубани. – 2009. – №5. – С. 1-2
10. Sanders B., Koldijk M., Schuitemaker H. Inactivated viral vaccines // Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control // Berlin, Heidelberg; Springer. – 2015.- №2. – P. 45-80
11. Кыдырбаев Ж., Асанжанова Н.Н., Рыскелдинова Ш.Ж., Кожамкулов Е.М., Кулбеков Е.К., Мырзахметов Е.Т., Турсынова Ж.А., Акмырзаев Н.Ж. Аprobационные испытания вакцины против болезни Ньюкасла из штамма Ла-Сота // Биобезопасность и биотехнология. – 2022. - №9. – С. 34-43
12. Асанжанова Н.Н., Кыдырбаев Ж., Рыскелдинова Ш.Ж., Кожамкулов Е.М., Акмырзаев Н.Ж., Мырзахметов Е. Т. Аprobационные испытания вакцины против болезни Ньюкасла из штамма «Н» // Известия НАН КР. – 2023. - №2. – С. 51-57
13. Reed L J, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Am J Hyg. – 1938. - №27. – P. 493-497
14. King D.J. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum // Avian. Dis. – 1991. - №35. – P. 505
15. Yi-Min Sh., Keding Ch., Farnsworth A., Xuguang L, Terry D.C. Surface modifications of influenza proteins upon virus inactivation by β -propiolactone // Proteomics. – 2013. - № 23-24. – P. 35-47
16. Еремец Н.К., Еремец В.И., Самуйленко А.Я., Бобровская И.В., Матвеева И.Н., Еремец О.В. Изыскание эффективных инактивантов при производстве противовирусных вакцин // Ветеринария. – 2009. - №3. – С. 692
17. Методические указания по определению уровня антител к вирусу Ньюкаслской болезни в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) // Болезни птиц. – 1997. - №13. – С.448-453.
18. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses // Rev. Sci. Tech. – 2000. - №19. – С. 12-31
19. Garnier R., Rousselin X., Rosenberg N. Formaldehyde toxicity – A review. // Inst. Nat. Rech. Stcur. – 1989. - №134. – P. 63-85
20. Gard S., Lycke E. Inactivation of poliovirus by formaldehyde; analysis of inactivation curves // Arch. Gesamte. Virusforsch. – 1957. - №7. – P. 471-482.