

Молдагулова Н.Б.¹, Кыдырбаев Ж.К.², Усубалиев А.²,
Кожамкулов Е.М.², Кожahanулы А.².

ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА H7N1 НА ЭМБРИОНАХ

¹РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, г. Астана,
Казахстан E.mail M_nazira1967@mail.ru

²РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности КН МОН
РК, п.г.т. Гвардейский, Казахстан

В настоящее время грипп птиц распространен во многих странах азиатского, американского и европейского континентов. Особенно необходимо отметить вирусы подтипов H5N1, H7N7, H9N2 и, возможно, H7N1, которые потенциально опасны для людей [1, 2]. Во всех случаях возбудителями вспышек высокопатогенного гриппа птиц являлись вирусы с подтипами гемагглютинина H5 (63,5%) и H7 (32,7%), наиболее часто регистрировался высокопатогенный грипп H5N1 (48,1%) [1-3].

Первый наиболее серьезный случай эпизоотии гриппа птиц подтипа H7 возник в Пакистане в декабре 1994, затем в 1999 г. на севере Италии. В Чили 2002 г. был выделен низкопатогенный штамм H7N3, а в начале 2003 г. совершенно неожиданно высоковирулентный грипп птиц H7N7 возник в Нидерландах [3-6]. Анализируя вышеизложенное следует, что в современном мире ни одно государство с развитой птицеводческой промышленностью не застраховано от внезапного возникновения гриппа птиц подтипа H7. Важность проблемы подчеркивается не только колоссальным экономическим ущербом от данного заболевания, но и потенциально высокой антропогенной опасностью возбудителя.

Высокая вероятность эпизоотических вспышек высокопатогенного гриппа птиц H7 в мире требует проведения экстренных мероприятий по предупреждению и ликвидации заболевания. В системе мер по предупреждению и ликвидации гриппа птиц вакцинация имеет одно из главнейших значений.

В этой связи научные исследования в сфере разработки технологии изготовления вакцин против гриппа птиц являются актуальной проблемой, имеющей одновременно эпидемиологическое и стратегическое значение для Республики Казахстан. Для создания таких вакцин сначала необходимо изучить культуральные свойства вируса гриппа птиц с подтипом гемагглютинина H7.

Материалы и методы

В процессе исследований был использован штамм А/цыпленок/Росток/29(H7N1) вируса гриппа птиц. Культивирование вируса гриппа птиц проводили на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) 10-12 сут. возраста.

Для культивирования вируса эмбрионы инфицировали в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Инфицированные эмбрионы инкубировали в течение 24-72 ч. и при температуре 36⁰С. Гибель эмбрионов в течение первых 20 ч. считали неспецифической, поэтому такие эмбрионы утилизировали. Инфицированные РКЭ, погибшие после 20 ч. и более, после заражения охлаждали при температуре 2-4⁰С в течение 16-18 ч. Затем отбирали аллантоисную жидкость (АЖ) в стерильные флаконы.

Результаты исследований.

Для получения высокоактивного вирусосодержащего материала на эмбрионах в начале этапа определяли уровень накопления вируса в зависимости от дозы заражения. Для этого куриные эмбрионы в возрасте 12 сут. инфицировали в дозах от 10 до 10000 ЭИД₅₀ в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Образцы аллантоисной жидкости для определения

инфекционной и гемагглютинирующей активности репродуцированного вируса приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Уровень накопления штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) ВГП в зависимости от заражающей дозы вируса

($X \pm m$), n=3

№ п/п	Доза заражения КЭ, ЭИД ₅₀	Кол-во КЭ погибшие /всего в опыте	Время гибели КЭ, ч.	Активность	
				гемагглютинирующая	инфекционная, lg ЭИД ₅₀ /см ³
1	10	5 / 10	32-50	1:64	9,0±0,15
2	100	10 / 10	24-42	1:256	10,7±0,08
3	1000	10 / 10	24-30	1:1024	11,20±0,07
4	10000	10 / 10	24	1:1024	9,0±0,15
5	100000	10 / 10	24	1:256	н/и

Данные таблицы 1 показывают, что максимальный уровень накопления вируса отмечается при инфицировании РКЭ в дозе 1000 ЭИД₅₀. Увеличение дозы вируса на эмбрион не приводило к адекватному увеличению инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса. Установлена зависимость сроков гибели РКЭ от дозы заражения вируса. С увеличением дозы вируса отмечается сравнительно низкая инфекционная активность вируса и повышенная гибель эмбрионов, начиная после 24 ч. заражения. В дозе ниже 100 ЭИД₅₀ установлено, что 50% инфицированных КЭ оставались живыми, вирус в них не накапливался. Исходя из вышеперечисленного, оптимальной заражающей дозой штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) ВГП для РКЭ является 1000 ЭИД₅₀.

В следующих сериях опытов определяли уровень накопления штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) в зависимости от возраста инфицированных куриных эмбрионов. Для этого инфицировали 10, 11, 12, 13 сут КЭ вирусом в дозе 1000 ЭИД₅₀. Одновременно учитывали объем АЖ в зависимости от возраста инфицированных РКЭ, имеющих большое значение в производстве инактивированных вакцин. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что уровень накопления вируса зависит от возраста куриных эмбрионов. С увеличением возраста куриных эмбрионов продлевался срок их гибели, что способствовало максимальному накоплению вируса. Наибольшее накопление вируса отмечалось при инфицировании 12-сут РКЭ, наибольший объем вирусосодержащей АЖ также получен при инфицировании 12-сут РКЭ. При этом средний объем АЖ составил 7,4 см³, что на 5-65% больше чем при инфицировании 10,11,13-сут РКЭ.

Таблица 2 – Уровень накопления штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) ВГП в зависимости от возраста инфицированных куриных эмбрионов

($X \pm m$), n=3

Возраст КЭ, сут	Кол-во РКЭ погибшие /всего в опыте	Время гибели КЭ, ч.	Активность		Средний объем, собран-го АЖ
			гемагглютинирующая	инфекционная, lg ЭИД ₅₀ /см ³	
10	20 / 20	24-26	1:1024	9,11±0,15	2,6-3,0
11	20 / 20	26	1:1024	10,2±0,08	4,1-6,0
12	20 / 20	26-28	1:1024	11,20±0,07	7,4-10,0
13	20 / 20	26-30	1:512	9,45±0,07	7,1-9,5

В следующих экспериментах определяли уровень накопления штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) ВГП в зависимости от температуры инкубирования инфицированных РКЭ. С этой целью в аллантоисную полость в дозе 1000 ЭИД₅₀ инфицировали 12-сут РКЭ (оптимальный возраст) и инкубировали при температурах 35, 36, 37, 38⁰С в течение 72 часов. От погибших и живых РКЭ также отбирали образцы АЖ для определения инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса. Результаты исследований приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Уровень накопления штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) ВГП в зависимости от температуры инкубирования инфицированных куриных эмбрионов

(X±m), n=3

Температура инкубирования, t ⁰ С	Кол-во РКЭ погибшие /всего в опыте	Время гибели РКЭ, ч	Активность	
			гемагглютинирующая	инфекционная, lg ЭИД ₅₀ /см ³
35	10 / 10	26-30	1:1024	10,45±0,07
36	10 / 10	26-28	1:2048	11,0±0,0
37	10 / 10	24-26	1:512	10,3±0,15
38	10 / 10	24-26	1:1024	10, 61±0,15

Из данных таблицы видно, что апробированные температуры инкубирования инфицированных эмбрионов не оказывали существенного влияния на уровень накопления вируса. Однако наилучшие результаты получены при температуре инкубирования 36⁰С. Корреляции между инфекционной и гемагглютинирующей активностью вируса не установлены.

Таким образом, наибольшее накопление штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) вируса гриппа птиц происходит при инфицировании 12-сут. РКЭ и температуре инкубирования 36⁰С.

На основании проведенных исследований установлены следующие параметры культивирования штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) вируса гриппа птиц на РКЭ:

- оптимальный возраст РКЭ 12 сут;
- заражающая доза вируса 1000 ЭИД₅₀;
- температура инкубирования 36⁰С;
- продолжительность инкубирования 26-28 ч.

При соблюдении указанных параметров культивирования штамма А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) вируса гриппа птиц можно получить вирусосодержащую АЖ с инфекционной и гемагглютинирующей активностью свыше 10,5 lg ЭИД₅₀/см³ и 1:512-1:2048, соответственно, что вполне соответствует предъявляемым требованиям при изготовлении инактивированных вакцин против этой болезни.

Литература

1. World Health Organization (WHO), 2006. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_04_4/en/index/html.
2. Butler D. Alarms ring over bird flu mutations //Nature. - 2006. - Vol. 439. - 19 January. - P. 248-249.
3. Capua I., Cattoli G., Marangon S., Bortolotti L. & Orтали G. (2002). Strategies for the control of avian influenza in Italy. *Vet. Rec.*, 150, 223.
4. 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.
5. Naeem K., Ullah A., Manvell R.J. & Alexander D .J. (1999). Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *Vet. Rec.*, 145, 560.
6. Swayne D.E. & Akey B . (2004). Avian influenza control strategies in the United States of America. *In: Proceedings of the Frontis Workshop on Avian Influenza Prevention and Control, Wageningen, The Netherlands, 13–15 October 2003*, R.S. Schrijver & Koch G., eds. <http://www.wur.nl/frontis/>

Тауық эмбриондарында құс тұмауы вирусының оптималды өсіру жағдайлары вирустың мөлшеріне, өсіру уақытына, температурасына және тауық эмбрионының жасына байланысты анықталған

Summary

Optimal conditions for culturing bird influenza virus in developing chicken embryos were estimated depending on infection dose, incubation time, temperature and age of infected embryo.

УДК 57.043:579

Молдагулова Н.Б.¹, Ахметова Д.Г.¹, Кушугулова А.Р.¹, Секербаева А.М.²,
Абзалханова Г.Т.²

СОХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEA*, ИМЕЮЩИХ МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

¹ДГП «Республиканская коллекция микроорганизмов». Ярмамбетов К.Б. «Детская инфекционная больница», г. Астана, Казахстан, e.mail M_nazira1967@mail.ru.

²«Городская инфекционная больница», Омарбаева Б.К.³, «Региональный противотуберкулезный диспансер», Аманкулова У.П.⁴ ЦЭС РГКП, г. Семей, Казахстан

Семейство *Enterobacteriaceae* – самое многочисленное представительство микроорганизмов, вызывающих широко распространенные заболевания у людей, животных и растений [1, 2]. В медицинской практике уделяется большое внимание созданию коллекций штаммов бактерий, особенно выделенных из клинического материала. Такие коллекции могут быть использованы для изучения механизмов антибиотикорезистентности бактерий, проведения исследований антимикробного действия новых антибиотиков и разработки рациональных схем антибиотикотерапии в данной области. Для хранения микроорганизмов современным на сегодняшний момент, общепринятым методом является криохранение при температурах от минус 20 °С до 196 °С [3].

Криоконсервация (криоанабиоз) является наиболее перспективным методом долгосрочного хранения микроорганизмов [4]. При криоконсервации удается получить высокий уровень жизнеспособных клеток, титр которых при длительном хранении в жидком азоте сохраняется на исходном уровне, что делает практически неограниченным возможное время хранения [5]. Однако, грамотрицательные бактерии, к числу которых относится кишечная палочка, обладают повышенной чувствительностью к стрессовым воздействиям во время консервации. Это, по видимому, связано с химическим составом и строением их клеточной стенки и мембран [6]. Поэтому поиск оптимальных режимов хранения, обеспечивающих высокую жизнеспособность и стабильность биологических свойств грамотрицательных бактерий, является актуальным.

В «Республиканской коллекции микроорганизмов» проводятся исследования по созданию коллекции культур бактерий медицинского назначения, которые могут быть использованы в медицине и в биотехнологии для разработки тест-систем, хромогенных сред, для составления эпидемиологической карты и изучения антибиотикорезистентности выделенных культур, а также для выделения бактериофагов. При сборе коллекционных культур остро стоял вопрос о сохраняемости выделенных микроорганизмов. В связи с этим нами были изучены условия хранения культур семейства энтеробактерий.

Материалы и методы исследований.

Для работы использовали энтеробактерии выделенные из клинического материала. Материалы собирали из инфекционных больниц г. Астаны и г. Семей. Всего было выделено около 145 проб биоматериала из семейства энтеробактерий, относящихся к следующим родам: *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Morganella* и *Shigella*.

Для криоконсервации использовали следующие виды защитной среды:

- 50% глицерин+ триптозосоевый бульон;
- 20% глицерин+20% сахара+10% поливинилпироллидон;