

УДК: 578.832.1:578.083.24

DOI: [10.52754/16948610_2026_3_5](https://doi.org/10.52754/16948610_2026_3_5)

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА «БИЭМГ-51»
ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ В РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ**

ӨНҮГҮП ЖАТКАН ТООК ЭМБРИОНДОРУНДА «БИЭМГ-51» ВАКЦИНА ВИРУСУ
ШТАММЫН ӨСТҮРҮҮ ПАРАМЕТРЛЕРИ

CULTIVATION PARAMETERS OF THE “BIEMG-51” VACCINIA VIRUS STRAIN IN
DEVELOPING CHICKEN EMBRYOS

Алиева Алина Бейсеновна

Алиева Алина Бейсеновна

Aliyeva Alina Beisenovna

**ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ Республики
Казахстан**

*Қазақстан Республикасының Саламаттық сактоо министрлігіне қарайтуу Биологиялық коопсуздук
көйгөйлөрүнүн илимий-изилдөө институтунун улук илимий кызматкери*

*Senior Researcher at the Research Institute for Biological Safety Problems under the Ministry of Healthcare of the
Republic of Kazakhstan*

a.aliyeva@biosafety.kz

ORCID: 0009-0002-2998-2610

Жунушов Асанкадыр Темирбекович

Жунушов Асанкадыр Темирбекович

Asankadyr Temirbekovich Zhunushov

д.в.н., профессор, член-корреспондент НАН КР

*в.и.д., профессор, Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын корреспондент-мүчөсү
Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of the*

Kyrgyz Republic

Бердибаева Аида Бердибаевна

Бердибаева Аида Бердибаевна

Aida Berdibayevna Berdibaeva

к.с.-х.н., учёный секретарь Института биотехнологии НАН КР

*а.-ч.и.к., Кыргыз Республикасынын Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун
окумуштуу катчысы*

*Candidate of Agricultural Sciences, Scientific Secretary of the Institute of Biotechnology of the National Academy of
Sciences of the Kyrgyz Republic*

aidaberdibaeva@rambler.ru

Килибаев Санат Серикович

Килибаев Санат Серикович

Kilybaev Sanat Serikovich

**заведующий лабораторией, к.в.н., ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности» МЗ РК**

лаборатория баичысы, в.и.к., Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигине караштуу
Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрүнүн илимий-изилдөө институту ЖЧКсы
Head of Laboratory, Candidate of Veterinary Sciences, Research Institute for Biological Safety Problems LLP under
the Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan
s.kilibayev@biosafety.kz

Азанбекова Молдир
Азанбекова Молдир
Moldir Azanbekova

**старший научный сотрудник, PhD, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности» МЗ РК**
PhD, Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигине караштуу Биологиялык коопсуздук
көйгөйлөрүнүн илимий-изилдөө институтунун улук илимий кызматкери
PhD, Senior Researcher at the Research Institute for Biological Safety Problems under the Ministry of Healthcare of
the Republic of Kazakhstan
azanbekova.m@biosafety.kz
ORCID: 0000-0002-5807-7604

Баракбаев Кайнар Базаркулович
Баракбаев Кайнар Базаркулович
Kainar Bazarkulovich Barakbayev

**заведующий лабораторией, к.в.н., ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности» МЗ РК**
лаборатория баичысы, в.и.к., Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигине караштуу
Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрүнүн илимий-изилдөө институту ЖЧКсы
Head of Laboratory, Candidate of Veterinary Sciences, Research Institute for Biological Safety Problems LLP under
the Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan
k.barakbayev@biosafety.kz
ORCID: 0000-0002-7701-5142

Жугунисов Куандык Даулетбаевич
Жугунисов Куандык Даулетбаевич
Kuandyk Dauletbayevich Zhugunisov

**генеральный директор, PhD, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности» МЗ РК**
PhD, Казакстан Республикасынын Саламаттык сактоо министрлигине караштуу Биологиялык коопсуздук
көйгөйлөрүнүн илимий-изилдөө институту ЖЧКсынын башкы директору
PhD, General Director of the Research Institute for Biological Safety Problems LLP under the Ministry of
Healthcare of the Republic of Kazakhstan
k.zhugunisov@biosafety.kz
ORCID: 0000-0003-4238-5116

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА «БИЭМГ-51» ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ В РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

Аннотация

В статье представлены результаты исследований по определению оптимальных параметров культивирования штамма «БИЭМГ-51» вируса осповакцины в развивающихся куриных эмбрионах на хорионаллантоисной оболочке. Актуальность исследования обусловлена необходимостью получения высокоактивного вирусосодержащего материала для разработки диагностических и профилактических средств против ортопоксвирусных инфекций. Целью исследования являлось определение оптимальных условий культивирования штамма «БИЭМГ-51» вируса осповакцины в развивающихся куриных эмбрионах. В работе использовали 9–13-суточные куриные эмбрионы, инфицированные вирусом в дозах от 10 до 100000 ЭИД50/0,2 см³. Инкубирование проводили при температурах (33 ± 1) °C, (35 ± 1) °C и (37 ± 1) °C в течение 24–144 часов. Биологическую активность вируса определяли методом титрования с расчётом ЭИД50 по методу Reed & Muench. Установлено, что оптимальными условиями являются заражающая доза 100 ЭИД50/0,2 см³, использование 11–12-суточных эмбрионов, температура (37 ± 1) °C и продолжительность культивирования 120 часов. При этом инфекционная активность вируса достигала 6,50±0,08 lg ЭИД50/см³.

Ключевые слова: вирус осповакцины, культивирование вирусов, развивающиеся куриные эмбрионы, хорион-аллантоисная оболочка, доза, биологическая активность

Өнүгүп жаткан тоок эмбриондорунда «БИЭМГ-51» вакцина вирусунун штаммын өстүрүү параметрлери

Cultivation Parameters Of The “Biemg-51” Vaccinia Virus Strain In Developing Chicken Embryos

Аннотация

Макалада хорионаллантоистик кабыктагы өнүгүп жаткан тоок эмбриондорунда «БИЭМГ-51» осповакцина вирусунун штаммын өстүрүүнүн оптималдуу параметрлерин аныктоо боюнча жүргүзүлгөн изилдөөлөрдүн жыйынтыктары берилген. Изилдөөнүн актуалдуулугу ортопоксвирустук инфекцияларга каршы диагностикалык жана профилактикалык каражаттарды иштеп чыгуу үчүн жогорку активдүү вирус камтыган материалды алуу зарылдыгы менен шартталган. Изилдөөнүн максаты «БИЭМГ-51» осповакцина вирусунун штаммын өнүгүп жаткан тоок эмбриондорунда өстүрүүнүн оптималдуу шарттарын аныктоо. Изилдөөдө 9–13 суткалык тоок эмбриондору колдонулуп, аларга 10дон 100000 ЭИД50/0,2 см³ чейин ар кандай дозада вирус жугузулган. Инкубациялоо (33 ± 1) °C, (35 ± 1) °C жана (37 ± 1) °C температураларда 24–144 саат аралыгында жүргүзүлгөн. Вирустун биологиялык активдүүлүгү Reed & Muench ыкмасы боюнча ЭИД50 эсептөө менен титрлөө жолу аркылуу аныкталган. Изилдөөнүн натыйжасында 100 ЭИД50/0,2 см³ жугузуучу доза, 11–12 суткалык эмбриондор, (37 ± 1) °C температура жана 120 сааттык өстүрүү мөөнөтү оптималдуу шарттар экени аныкталган. Бул шарттарда вирустун инфекциялык активдүүлүгү 6,50±0,08 lg ЭИД50/см³ деңгээлине жеткен. Алынган жыйынтыктар эмбриондордун жашы, жугузуучу доза, температура жана өстүрүү мөөнөтү вирустун репродукциясына жана вирус камтыган материалдын топтолуу деңгээлине олуттуу таасир этерин көрсөтөт.

Ачык сөздөр: осповакцина вирусун, вирустарды өстүрүү, өнүгүп жаткан тоок эмбриондору, хорион-аллантоистик кабык, доза, биологиялык активдүүлүк

Abstract

The article presents the results of studies aimed at determining the optimal cultivation parameters of the “BIEMG-51” vaccinia virus strain in developing chicken embryos on the chorioallantoic membrane. The relevance of the study is associated with the need to obtain highly active virus-containing material for the development of diagnostic and preventive tools against orthopoxvirus infections. The aim of the study was to determine the optimal conditions for cultivating the “BIEMG-51” vaccinia virus strain in developing chicken embryos. In the study, 9–13-day-old chicken embryos were infected with virus doses ranging from 10 to 100000 EID50/0.2 cm³. Incubation was carried out at temperatures of (33 ± 1) °C, (35 ± 1) °C, and (37 ± 1) °C for 24–144 hours. The biological activity of the virus was determined by titration with calculation of EID50 according to the Reed & Muench method. The optimal cultivation conditions were found to be an infectious dose of 100 EID50/0.2 cm³, the use of 11–12-day-old embryos, an incubation temperature of (37 ± 1) °C, and a cultivation period of 120 hours. Under these conditions, the infectious activity of the virus reached 6.50±0.08 lg EID50/cm³.

Keywords: vaccinia virus, virus cultivation, developing chicken embryos, chorioallantoic membrane, dose, biological activity

Введение

Вирус осповакцины (BOV) относится к представителям рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* (Haller et al., 2014). Вирус содержит двухцепочечную ДНК и характеризуется сложной структурной организацией. В естественных условиях к данному возбудителю восприимчивы не только коровы, но и лошади, мулы, буйволы, ослы, верблюды, кролики, а также человек. Источником инфекции являются больные животные, тогда как основными резервуарами и переносчиками вируса считаются дикие и синантропные грызуны (Chantrey et al., 1999; Rimoïn et al., 2010). Благодаря широкому кругу восприимчивых хозяев и способности к межвидовой передаче вирус осповакцины представляет интерес, как для фундаментальных исследований, так и для разработки диагностических и профилактических средств против ортопоксвирусных инфекций.

В литературных источниках имеются сведения об инфицировании и заболеваниях человека, вызванных зоонозными ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян (MPXV) (Dubois & Slifka, 2008), вирус оспы коров (CPXV) (Ninove et al., 2009), вирус осповакцины (VACV) (Oliveira et al., 2017) и вирус Ахмета (Akhmeta virus) (Вора и др., 2016). В последние годы интерес к ортопоксвирусам значительно возрос, что связано с регистрацией вспышек среди животных и людей, расширением ареалов циркуляции возбудителей, а также риском их межвидовой передачи. После прекращения массовой вакцинации против натуральной оспы уровень коллективного иммунитета к ортопоксвирусам существенно снизился, что создало предпосылки для более широкого распространения зоонозных ортопоксвирусных инфекций (Dubois & Slifka, 2008; Ninove et al., 2009).

Циркуляция ортопоксвирусов среди диких и домашних животных зарегистрирована в различных регионах мира, включая Южную Америку, Африку, Европу, Ближний Восток и Азию (Вора и др., 2016; Franco-Luiz et al., 2014; Franco-Luiz et al., 2016; Singh et al., 2012). Основными природными резервуарами возбудителей считаются мелкие дикие грызуны, обеспечивающие длительное сохранение вирусов в природных очагах. Передача инфекции может происходить как при непосредственном контакте с инфицированными животными, так и через контаминированные объекты окружающей среды. В ряде случаев ортопоксвирусы способны преодолевать межвидовые барьеры и вызывать заболевание у человека, что представляет потенциальную угрозу для ветеринарного и санитарно-эпидемиологического благополучия (de Oliveira et al., 2017; Doshi et al., 2019; Ducournau et al., 2013; Usme-Ciro et al., 2017; Venkatesan et al., 2010; Vogel et al., 2012).

В связи с этим вопросы обеспечения биологической и эпизоотологической безопасности приобретают особую актуальность. Изучение биологических свойств ортопоксвирусов, их способности к репродукции в различных биологических системах, а также совершенствование методов культивирования являются важными этапами при разработке диагностических и профилактических средств. Получение высокоактивного вируссодержащего материала во многом зависит от правильно подобранных условий культивирования, обеспечивающих максимальное накопление инфекционной активности вируса.

Одним из наиболее распространённых методов культивирования ортопоксвирусов является заражение развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) на хорионаллантоисную

оболочку (ХАО). Данная биологическая система характеризуется высокой чувствительностью к ортопоксвирусам, доступностью и относительной простотой применения, что позволяет получать значительные объёмы вирусного материала (Ninove et al., 2009). Репродукция вируса на ХАО сопровождается образованием характерных очагов поражения, что даёт возможность оценивать инфекционную активность вируса и особенности взаимодействия вируса с клетками эмбриональных тканей. Кроме того, РКЭ широко используются в технологии производства вирусных вакцин, а также при проведении экспериментальных и диагностических исследований.

Несмотря на наличие работ, посвящённых ортопоксвирусам, сведения о свойствах отдельных штаммов ВОВ и параметрах их культивирования в доступной литературе ограничены. Имеются отдельные сообщения о возможности культивирования вирусов оспы коз, кур и верблюдов на 12-суточных куриных эмбрионах (Абдураимов и др., 1998; Борисевич & Орехов, 1966; Диев и др., 2003; Кутумбетов & Мырзахметова, 2021; Сюрин и др., 1998), а также в культурах клеток ПЯ и Vero (Кутумбетов & Мырзахметова, 2021). Вместе с тем данные, касающиеся оптимизации параметров культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ на РКЭ, практически отсутствуют. Недостаточная изученность данного вопроса затрудняет получение стандартизированного вирусного материала с высокой инфекционной активностью, необходимого для проведения экспериментальных исследований и разработки профилактических препаратов.

В связи с этим целью настоящего исследования являлось определение оптимальных параметров культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ на РКЭ, обеспечивающих получение высокоактивных вирусосодержащих материалов, пригодных для проведения экспериментальных работ, а также используемых при разработке диагностических и профилактических средств.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм «БИЭМГ-51» ВОВ, полученный из лаборатории «Коллекция микроорганизмов». Штамм был адаптирован к РКЭ путём последовательного пассирования на ХАО и использовался после 6 пассажей. Инфекционная активность вируса составляла $4,45 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Вирусный материал применяли в лиофилизированном виде, хранившемся в герметично запаянных ампулах под вакуумом при температуре минус 40°C .

В качестве биологической системы использовали РКЭ 9–13-суточного возраста с хорошо выраженной сосудистой системой. Перед заражением эмбрионы овоскопировали для оценки их жизнеспособности. Далее для изучения репродуктивных свойств штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ были проведены исследования по определению оптимальной заражающей дозы, температуры и продолжительности культивирования вируса.

С целью определения оптимальной заражающей дозы вирус вносили на ХАО РКЭ в диапазоне от 10 до $100000 \text{ ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$. Дополнительно проводили исследования по подбору наиболее благоприятной температуры и сроков культивирования. Инкубацию заражённых эмбрионов осуществляли при температурах $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение до 7 суток.

После заражения за эмбрионами вели ежедневное наблюдение с использованием овоскопа. Погибшие эмбрионы отбирали и оценивали сроки их гибели. Гибель эмбрионов в первые 48 часов после заражения расценивали как неспецифическую, такие эмбрионы

отбраковывали и подвергали обезвреживанию. Для этого их помещали в ёмкости с дезинфицирующим раствором с последующим автоклавированием при температуре (121 ± 2) °C в течение 1 часа.

Эмбрионы, погибшие начиная с 3-х суток инкубирования, а также эмбрионы, оставшиеся живыми до окончания опыта, охлаждали при температуре (4 ± 2) °C не менее 18 часов. После охлаждения эмбрионы вскрывали и проводили визуальную оценку ХАО на наличие характерных оспенных бляшек. ХАО с типичными очагами поражения извлекали стерильными инструментами и помещали в стерильные флаконы для последующего определения инфекционной активности вируса.

Биологическую активность вируса определяли общепринятым методом титрования на 12-суточных РКЭ. Учёт результатов проводили по методу L. Reed и H. Muench с выражением показателей в десятичных логарифмах ЭИД₅₀/см³ (эмбриональная инфицирующая доза) (Franco-Luiz et al., 2014). Критерием оценки титра считали наличие и интенсивность образования характерных оспенных бляшек на ХАО РКЭ.

В качестве отрицательного контроля использовали 2–3 незаражённых эмбриона, которым на ХАО наносили стерильный физиологический раствор (0,9 % раствор хлорида натрия) в аналогичном объёме.

Статистическую обработку результатов проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с использованием программы GraphPad Prism 8.

Результаты исследований

В ходе проведённых исследований установлено, что штамм «БИЭМГ-51» ВОВ активно репродуцируется в клетках ХАО РКЭ. Репродукция вируса происходила преимущественно в эпителиоцитах хориона, сопровождаясь образованием характерных оспин различной формы, диаметра и степени выраженности.

Первые визуальные изменения на ХАО инфицированных РКЭ отмечались, начиная с 48 часов инкубирования. В этот период наблюдалось локальное уплотнение эпителия хориона в местах репродукции вируса. По мере увеличения сроков культивирования изменения становились более выраженными и сопровождалась формированием типичных оспенных поражений. Особенностью оспин, вызванных штаммом «БИЭМГ-51» ВОВ, являлось наличие характерного геморрагического шлейфа, наиболее отчётливо визуализируемого через 72–96 часов инкубирования. Наличие геморрагических изменений свидетельствовало об активной репродукции вируса и выраженном цитопатическом действии на ткани хорионлантоисной оболочки.

Следует отметить, что степень выраженности поражений зависела от используемой заражающей дозы и сроков культивирования. При оптимальных условиях наблюдалось образование крупных, хорошо визуализируемых оспин с чёткими границами, что позволяло проводить объективную оценку инфекционной активности вируса. В контрольной группе эмбрионов, инфицированных физиологическим раствором, патологических изменений и образования бляшек на ХАО не отмечали.

На начальном этапе исследований по определению оптимальных параметров культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ изучали уровень накопления вируса в зависимости от заражающей дозы. Для этого использовали дозы вируса от 10 до 100000

ЭИД₅₀ при одинаковых условиях культивирования. Оценку репродукции вируса проводили по степени образования оспенных бляшек на ХАО и уровню инфекционной активности вируссодержащего материала. Результаты исследований по определению инфекционной активности штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в зависимости от заражающей дозы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Уровень накопления вируса в РКЭ в зависимости от заражающей дозы

Доза заражения, ЭИД ₅₀ /0,2 см ³	Инфекционная активность, lg ЭИД ₅₀ /см ³ , Mean ± SD (n=3)
100000	4,25±0,08
10000	4,65±0,14
1000	5,00±0,14
100	6,33±0,08
10	5,00±0,08
<i>Примечание: Различия между группами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), статистически значимыми считали различия при p<0,05.</i>	

Данные таблицы 1 показывают, что наиболее оптимальной заражающей дозой для культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ является доза 100 ЭИД₅₀/0,2 см³. При использовании данной дозы отмечалось максимальное накопление вируса с инфекционной активностью 6,33±0,08 lg ЭИД₅₀/см³.

При инфицировании ХАО РКЭ дозой 10000 ЭИД₅₀/0,2 см³ уровень накопления вируса был ниже и составлял 4,65±0,14 lg ЭИД₅₀/см³. В то же время при заражении дозами 10 и 1000 ЭИД₅₀/0,2 см³ инфекционная активность вируса составляла 5,00±0,14 и 5,00±0,08 lg ЭИД₅₀/см³ соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение заражающей дозы не всегда сопровождается повышением уровня накопления вируса. Вероятно, применение чрезмерно высоких доз вируса может приводить к более быстрому поражению тканей эмбриона и снижению эффективности дальнейшей репродукции вируса.

Следует отметить, что при использовании дозы 100 ЭИД₅₀/0,2 см³ на хорионаллантоисной оболочке формировались наиболее характерные и хорошо визуализируемые оспенные бляшки с выраженными морфологическими изменениями. При этом эмбрионы сохраняли жизнеспособность в течение всего периода культивирования, что способствовало более интенсивному накоплению вирусного материала.

На основании полученных данных для дальнейших исследований в качестве оптимальной заражающей дозы для инфицирования РКЭ штаммом «БИЭМГ-51» ВОВ была выбрана доза 100 ЭИД₅₀/0,2 см³.

На следующем этапе исследований изучали влияние температуры инкубирования и сроков культивирования на репродукцию штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ. В опытах использовали 12-суточные развивающиеся куриные эмбрионы, которым на ХАО вводили по 0,2 см³ вируссодержащего материала в дозе 100 ЭИД₅₀. Инфицированные эмбрионы инкубировали при температурах (33 ± 1) °С, (35 ± 1) °С и (37 ± 1) °С при относительной влажности воздуха 55 ± 5 % в течение 24, 48, 72, 96, 120 и 144 часов.

В процессе исследований установлено, что температурный режим оказывает существенное влияние на интенсивность репродукции вируса и уровень его накопления в тканях ХАО. По мере увеличения сроков инкубирования отмечалось постепенное усиление

патологических изменений на ХАО, сопровождавшееся образованием типичных оспенных поражений различной степени выраженности. Максимальное накопление вируса наблюдалось при наиболее благоприятных температурных условиях культивирования, обеспечивающих активную репродукцию штамма «БИЭМГ-51» ВОВ. Результаты исследований по определению влияния температуры и сроков культивирования на уровень накопления вируса представлены на рисунке 1.

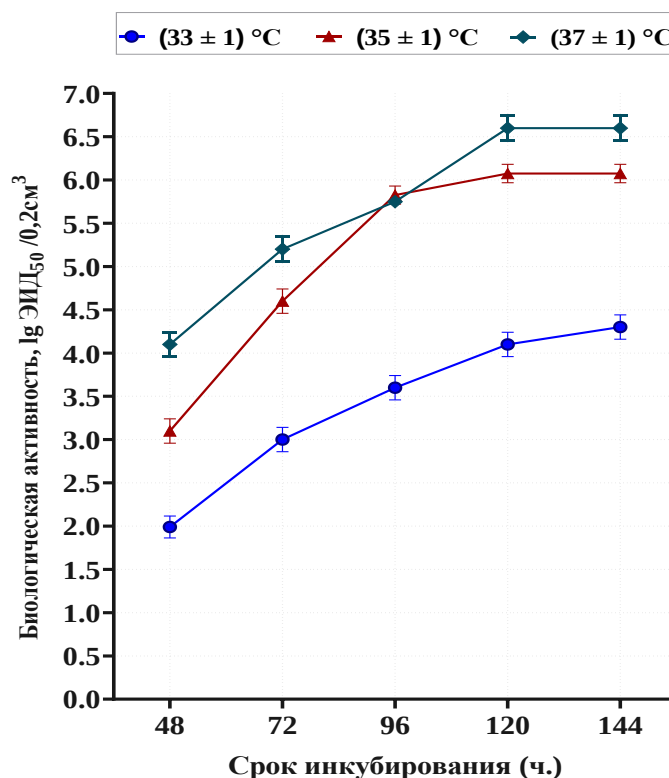


Рисунок 1. Уровень накопления ВОВ в РКЭ в зависимости от температуры инкубирования и срока культивирования

Из данных, представленных на рисунке 1, видно, что сроки культивирования и температура инкубирования оказывают существенное влияние на уровень накопления штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ. Установлено, что при температурах инкубирования $(33-35) \pm 1$ °C биологическая активность вируса в различные сроки культивирования оставалась сравнительно низкой и в период от 48 до 96 часов составляла от 2,0 до $5,75 \pm 0,08$ lg ЭИД₅₀/см³. При указанных температурных режимах репродукция вируса происходила менее интенсивно, что сопровождалось более слабовыраженными изменениями на ХАО и меньшим количеством характерных оспенных поражений.

Наиболее интенсивное накопление вируса отмечалось в РКЭ, инкубируемых при температуре (37 ± 1) °C. При данном температурном режиме уже начиная с 72–96 часов наблюдалось формирование типичных оспенных бляшек с выраженными морфологическими изменениями на ХАО. Максимальная биологическая активность вируса была зарегистрирована через 120 часов инкубирования и составила $6,50 \pm 0,08$ lg ЭИД₅₀/см³. В последующие сроки культивирования существенного увеличения инфекционной активности не отмечалось.

Следует отметить, что при сроках культивирования 120–144 часа между титрами биологической активности вируса, инкубированного при температурах (37 ± 1) °C,

статистически достоверных различий выявлено не было ($P>0,100$). Это свидетельствует о том, что дальнейшее увеличение продолжительности инкубирования после 120 часов не приводит к значительному повышению уровня накопления вируса. Вероятно, к данному периоду репродукция вируса достигает максимального уровня, после чего стабилизируется.

Полученные результаты показывают, что температурный режим и продолжительность культивирования являются одними из ключевых факторов, определяющих эффективность репродукции штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ.

Таким образом, на основании анализа экспериментальных данных установлено, что оптимальным сроком культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ является 120 часов при температуре инкубирования (37 ± 1) °C. Именно при данных условиях наблюдалось максимальное накопление вируса и формирование наиболее характерных изменений на хорионаллантоисной оболочке.

Заключительным этапом исследований по оптимизации условий культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ являлось определение влияния возраста эмбрионов на уровень накопления вируса. С этой целью проводили инфицирование РКЭ 9, 10, 11, 12 и 13-суточного возраста заражающими дозами от 10 до 10000 ЭИД₅₀. Оценку репродукции вируса осуществляли по степени поражения ХАО и уровню инфекционной активности вирусосодержащего материала. Результаты проведённых исследований представлены на рисунке 2.

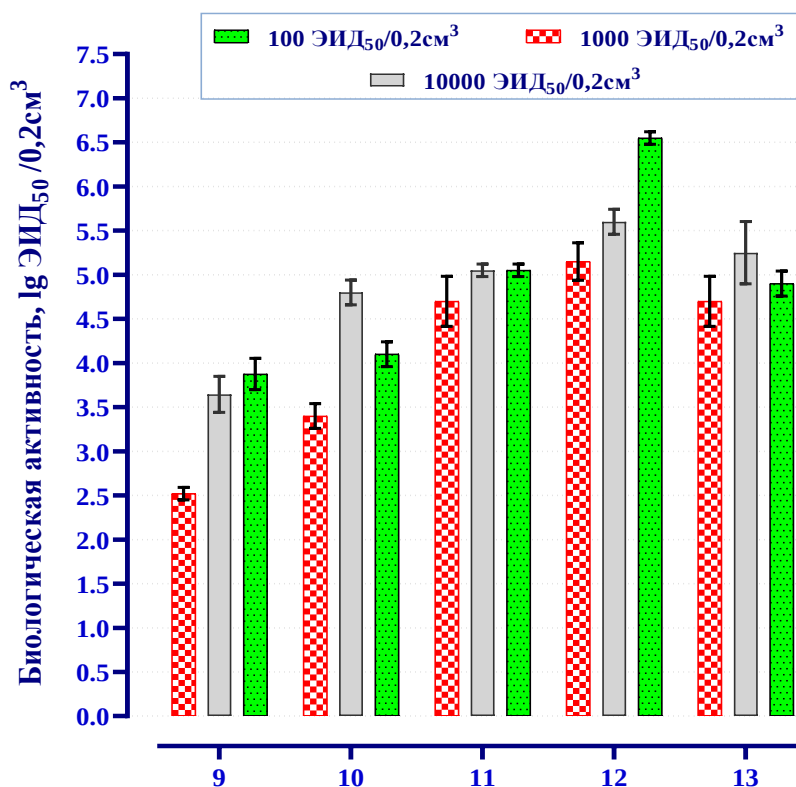


Рисунок 2. Уровень накопления штамма «БИЭМГ-51» ВОВ в РКЭ в зависимости от их возраста

Из данных, представленных на рисунке 2, следует, что репродукция штамма «БИЭМГ-51» ВОВ наблюдалась во всех исследованных РКЭ 9–13-суточного возраста. При этом уровень инфекционной активности вируса варьировал в пределах от $2,47 \pm 0,08$ до $6,50 \pm 0,08$

$\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, что свидетельствует о способности штамма эффективно размножаться в эмбриональной системе при различных сроках развития эмбрионов.

Вместе с тем установлено, что возраст РКЭ оказывает существенное влияние на интенсивность накопления вируса. При инфицировании РКЭ 9–10-суточного возраста часть эмбрионов погибала уже в первые 1–2 суток после заражения. Вероятно, это связано с повышенной чувствительностью молодых эмбрионов к воздействию вируса и недостаточной устойчивостью эмбриональных тканей к инфекционному процессу. Преждевременная гибель эмбрионов приводила к уменьшению объёма получаемого вирусного материала и, соответственно, к снижению уровня накопления вируса на ХАО. В данных группах биологическая активность вируса составляла от $2,47 \pm 0,08$ до $4,75 \pm 0,08 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Наиболее высокие показатели накопления вируса были получены при заражении РКЭ 11–12-суточного возраста в дозе 100 ЭИД_{50} . В данных условиях инфекционная активность вирусосодержащей суспензии достигала $6,50 \pm 0,08 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. При этом на ХАО наблюдалось образование четко выраженных типичных оспенных бляшек с характерными морфологическими изменениями. Эмбрионы сохраняли жизнеспособность в течение всего срока культивирования, что обеспечивало более интенсивную репродукцию вируса и накопление вирусного материала.

При заражении 13-суточных РКЭ уровень биологической активности вируса снижался до $5,00 \pm 0,08 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее оптимальными для культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ являются РКЭ 11–12-суточного возраста. Однако с учётом стабильности результатов, высокой инфекционной активности вируса и удобства проведения экспериментальных работ для дальнейшего культивирования штамма были выбраны РКЭ 12-суточного возраста.

Таким образом, анализ полученных данных показывает, что штамм «БИЭМГ-51» ВОВ способен эффективно репродуцироваться в РКЭ при всех апробированных условиях культивирования. При этом уровень накопления вируса зависит от возраста эмбрионов, заражающей дозы, температуры и сроков инкубирования. Оптимизация данных параметров позволяет обеспечить получение высокоактивного вирусосодержащего материала, пригодного для дальнейших экспериментальных исследований и разработки диагностических и профилактических средств.

Обсуждение. Одной из наиболее чувствительных и широко используемых биологических систем для культивирования вирусов являются развивающиеся куриные эмбрионы (Stern, 2018). Впервые данная биологическая модель была применена Раусом в 1911 году при выделении вируса саркомы кур (Мейхи, 1988). В дальнейшем куриные эмбрионы получили широкое распространение в вирусологической практике благодаря своей доступности, высокой чувствительности к различным вирусам и возможности получения значительных объёмов вирусного материала. В настоящее время они используются как для первичного выделения вирусов от больных животных и из объектов окружающей среды, так и для последующего культивирования вирусов в лабораторных условиях.

По данным ряда авторов (Волонтырь и др., 2019), особенностью куриного эмбриона как биологической модели является отсутствие влияния материнского организма, что позволяет более объективно оценивать воздействие различных факторов на процессы репродукции вируса. Кроме того, эмбрионы не требуют сложных условий содержания и искусственных поддерживающих сред, что делает их удобным и экономически доступным объектом для проведения вирусологических исследований. Важным преимуществом является и высокая степень бактериологической чистоты получаемого вирусного материала, обусловленная наличием естественных защитных структур — скорлупы и подскорлупной оболочки.

Существенным преимуществом культивирования вирусов на развивающихся куриных эмбрионах является их высокая чувствительность к широкому спектру вирусов. При этом в эмбрионе отсутствует полноценный иммунный ответ, сопровождающийся образованием антител, что способствует активной репродукции вируса. Дополнительными преимуществами являются быстрое развитие эмбриона, доступность наблюдения за изменениями в процессе эксперимента и возможность оценки результатов на различных стадиях заражения. Благодаря этим особенностям куриные эмбрионы на протяжении многих лет остаются одной из наиболее востребованных моделей в вирусологии и биотехнологии.

В ветеринарной и медицинской практике куриные эмбрионы широко применяются не только для изучения вирусов, но и для решения фундаментальных биологических задач. Классическая модель эмбриологии использовалась при исследовании процессов старения, кроветворения, формирования мышечной ткани и нервной системы (Dieterlen-Lièvre & Le Douarin, 2004; Holmes & Ottinger, 2003; Stern, 2006). Кроме того, эмбрионы птиц играют важную роль при производстве ряда вирусных вакцин и диагностических препаратов (Волонтырь и др., 2019). Это подтверждает значимость данной биологической системы как универсального объекта для экспериментальных исследований и прикладной биотехнологии.

Известно, что особенности репродукции вирусов во многом определяются их тропизмом к определённым тканям эмбриона. В зависимости от свойств возбудителя размножение вируса может происходить в различных структурах зародыша. Признаками репродукции вируса являются гибель эмбриона в характерные сроки, появление патологических изменений в тканях и оболочках, задержка развития заражённых эмбрионов по сравнению с контрольными, а также способность некоторых вирусов агглютинировать эритроциты кур (Бобина и др., 2018). При заражении ортопоксвирусами на хорионаллантоисной оболочке формируются характерные очаги поражения, позволяющие визуально оценивать интенсивность репродукции вируса и степень его накопления.

По литературным данным (Bessarabov, 2006; Tretyakov et al., 1990), эффективность получения вирусосодержащих жидкостей во многом зависит от правильного подбора параметров культивирования, включая возраст эмбрионов, температуру инкубирования, заражающую дозу и сроки инкубации. Нарушение данных параметров может приводить к снижению инфекционной активности вируса и уменьшению выхода вирусного материала. Поэтому определение оптимальных условий культивирования является одним из ключевых этапов при разработке технологий производства вирусных препаратов.

В проведённых нами исследованиях куриные эмбрионы показали высокую эффективность при культивировании штамма «БИЭМГ-51» ВОВ. Использование данной

биологической системы позволило контролировать процесс репродукции вируса на различных этапах эксперимента, а также проводить визуальную оценку изменений на хорионаллантоисной оболочке. В ходе исследований установлено, что подбор оптимальных параметров культивирования оказывает существенное влияние на уровень накопления вируса и качество получаемого вирусосодержащего материала.

Полученные результаты показали, что изменение температуры инкубирования, сроков культивирования и условий заражения непосредственно влияет на инфекционную активность штамма «БИЭМГ-51» ВОВ. При оптимальных параметрах отмечалось более интенсивное накопление вируса и формирование типичных очагов поражения на ХАО. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, указывающих на важную роль температурного режима и условий культивирования в процессах репродукции ортопоксвирусов.

Следует отметить, что оптимизация параметров культивирования имеет не только экспериментальное, но и практическое значение. Получение высокоактивных вирусосодержащих материалов необходимо для проведения дальнейших исследований, разработки диагностических тест-систем, а также создания профилактических препаратов. Кроме того, стандартизация условий культивирования позволяет повысить воспроизводимость результатов и обеспечить стабильное качество получаемого вирусного материала.

Таким образом, результаты проведённого исследования подтверждают перспективность использования развивающихся куриных эмбрионов для культивирования штамма «БИЭМГ-51» ВОВ. Установленные оптимальные параметры культивирования могут быть использованы при проведении экспериментальных исследований, а также при совершенствовании технологий получения вирусосодержащих материалов и разработке диагностических и профилактических средств против ортопоксвирусных инфекций.

Заключение. На основании проведённых исследований установлены оптимальные условия культивирования штамма «БИЭМГ-51» вируса осповакцины в развивающихся куриных эмбрионах. Оптимальными условиями являются:

1. Заражающая доза – $100 \text{ ЭИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$;
2. Температура инкубирования – $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
3. Продолжительность культивирования – 120 часов;
4. Использование 11–12-суточных развивающихся куриных эмбрионов.

При указанных условиях инфекционная активность вируса достигала $6,50 \pm 0,08 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке диагностических и профилактических препаратов против ортопоксвирусных инфекций, а также при совершенствовании технологий получения вирусосодержащих материалов.

Практические рекомендации

Полученные результаты рекомендуется использовать при разработке и совершенствовании технологий получения вирусосодержащих материалов на основе штамма «БИЭМГ-51» ВОВ. Для обеспечения максимального накопления вируса в развивающихся

куриных эмбрионах целесообразно применять заражающую дозу 100 ЭИД₅₀/0,2 см³, использовать 11–12-суточные развивающиеся куриные эмбрионы и проводить культивирование при температуре (37 ± 1) °C в течение 120 часов.

Установленные параметры могут быть использованы в научно-исследовательских работах, связанных с изучением биологических свойств ортопоксвирусов, а также при получении вирусного материала для разработки диагностических и профилактических препаратов. Стандартизация условий культивирования позволит повысить воспроизводимость результатов исследований, обеспечить стабильное накопление вируса и улучшить качество получаемого вирусосодержащего материала.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № BR218004/0223).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории «Коллекции микроорганизмов» и «Технологии готовых форм биопрепаратов» за оказанную помощь при выполнении научно-исследовательской работы по теме статьи и руководству ТОО «Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Абдураимов, Е.О., Мамбеталиев, М., & Кутумбетов, Л.Б. (1998). Изучение свойств вируса оспы коз в клеточных культурах. *Биотехнология: теория и практика*, 1–2(5–6), 9–11.
2. Бобина, Е.А., Корниенко, Е.И., & Горковенко, Н.Е. (2018). Биологические системы для культивирования вирусов. *Стратегии и тренды развития науки в современных условиях*, 1(4), 4–7.
3. Борисевич, Ю.Ф., & Орехов, М.Д. (1966). Оспа верблюдов. *Ветеринария*, 3, 50–53.
4. Волонтырь, А.В., Сарыгина, Е.В., Просвинова, К.А., & Потапова, А.Ю. (2019). *Куриный эмбрион как модельный объект в биологии*. Волгоград, Россия, 1–4.
5. Вора, Н.М., Гелеишвили, М., Хмаладзе, Э., Маглакелидзе, Г., Навдарашвили, А. (2016). Заражение человека зоонозным ортопоксвирусом в Грузии. *New England Journal of Medicine*, 375, 1223–1230.
6. Диев, В.И., Захаров, В.М., & Рахманов, А.М. (2003). Оспа овец и коз: Эпизоотическая ситуация и профилактика. *Ветеринария*, 11, 3–6.
7. Кутумбетов, Л.Б., & Мырзахметова, Б.Ш. (2021). *Оспенные болезни животных и биотехнология изготовления средств специфической профилактики*. Алматы.
8. Мейхи, Б. (Ред.). (1988). *Вирусология. Методы*. Москва: Мир.
9. Сюрин, В.Н., Самуйленко, А.Я., Соловьев, Б.В., & Фомина, Н.В. (1998). *Вирусные болезни животных*. Москва: ВНИТИБП.
10. Bessarabov, V.F. (2006). *Incubation of eggs with the basics of poultry embryology*. Moscow: KolosS.
11. Chantrey, J., Meyer, H., Baxby, D., Begon, M., Bown, K. J., Hazel, S. M., et al. (1999). Cowpox: Reservoir hosts and geographic range. *Epidemiology and Infection*, 122(3), 455–460.

12. de Oliveira, J.S., Figueiredo, P.O., Costa, G.B., De Assis, F.L., Drumond, B.P., Da Fonseca, F.G., et al. (2017). Vaccinia virus natural infections in Brazil: The good, the bad, and the ugly. *Viruses*, 9(11), 340.
13. Dieterlen-Lièvre, F., Le Douarin, N. M. (2004). From the hemangioblast to self-tolerance: A series of innovations gained from studies on the avian embryo. *Mechanisms of Development*, 121(9), 1117–1128.
14. Doshi, R.H., Guagliardo, S.A J., Doty, J.B., Babeaux, A.D., Matheny, A., Burgado, J., et al. (2019). Epidemiologic and ecologic investigations of monkeypox, Likouala Department, Republic of the Congo, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 25(2), 253–273.
15. Dubois, M.E., & Slifka, M.K. (2008). Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerging Infectious Diseases*, 14(4), 592–599. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071044>
16. Ducournau, C., Ferrier-Rembert, A., Ferraris, O., Joffre, A., Favier, A. L., Flusin, O., et al. (2013). Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), 1996–1998. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130256>
17. Franco-Luiz, A.P. M., Fagundes-Pereira, A., Costa, G.B., Alves, P. A., Oliveira, D.B., Bonjardim, C.A., et al. (2014). Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 20(9), 1576–1578. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140353>
18. Franco-Luiz, A.P.M., Oliveira, D.B., Pereira, A.F., Gasparini, M.C.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., et al. (2016). Detection of vaccinia virus in dairy cattle serum samples from 2009, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), 2174–2176. <https://doi.org/10.3201/eid2212.151916>
19. Haller, S.L., Peng, C., McFadden, G., & Rothenburg, S. (2014). Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 15–40. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.008>
20. Holmes, D.J., & Ottinger, M.A. (2003). Birds as long-lived animal models for the study of aging. *Experimental Gerontology*, 38(11–12), 1365–1375.
21. Tretyakov, N.P., Bessarabov, B.F., & Krok, G.S. (1990). *Inkubatsiya s osnovami embriologii [Incubation with the Basics of Embryology]*. Moscow: Agropromizdat.
22. Ninove, L., Domart, Y., Vervel, C., Voinot, C., Salez, N., Raoult, D., et al. (2009). Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 781–784. <https://doi.org/10.3201/eid1505.090235>
23. Rimoin, A.W., Mulembakani, P.M., Johnston, S.C., Lloyd-Smith, J.O., Kisalu, N.K., Kinkela, T.L., et al. (2010). Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16262–16267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
24. Singh, R.K., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Venkatesan, G., & Hosamani, M. (2012). Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: Global scenario and perspectives. *Indian Journal of Virology*, 28, 1–11.
25. Stern, C.D. (2006). Neural induction: 10 years on since the “default model”. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 692–697.
26. Stern, C.D. (2018). The chick model system: A distinguished past and a great future. *International Journal of Developmental Biology*, 62(1–2–3–4), 1–4.

27. Usme-Ciro, J.A., Paredes, A., Walteros, D.M., Tolosa-Pérez, E.N., Laiton-Donato, K., Pinzón, M.C., et al. (2017). Detection and molecular characterization of zoonotic poxviruses circulating in the Amazon region of Colombia, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 23(4), 649–652. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161565>
28. Vasiliev, Y.M. (2010). *Optimization of reproduction of avian influenza viruses in various substrates and improvement of inactivated vaccines against avian influenza virus (Candidate dissertation)*. Research Institute of Vaccines and Serums named after I. I. Mechnikov RAS, Moscow.
29. Venkatesan, G., Balamurugan, V., Prabhu, M., Yogisharadhya, R., Bora, D.P., Gandhale, P. N., et al. (2010). Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: A severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Veterinaria Italiana*, 46, 439–448.
30. Vogel, S., Sárdy, M., Glos, K., Korting, H. C., Ruzicka, T., & Wollenberg, A. (2012). The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: Transmission by infected pet rats. *Acta Dermato-Venereologica*, 92, 126–131.