



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-163>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Выбор эффективного режима инактивации вируса *Pseudopestis avium* (Paramyxoviridae: Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1) для изготовления вакцины против болезни Ньюкасла

Джекебеков К.К., Асанжанова Н.Н., Нурпейсова А.С., Рыскельдинова Ш.Ж., Абсатова Ж.С., Абай Ж.С., Шаяхметов Е.А., Омуртай А.Д., Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Шораева К.А., Закарья К.Д.

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

Введение. Болезнь Ньюкасла (БН) относится к категории особо опасных. Её основным источником является инфицированная и переболевшая птица. Всего через сутки после инфицирования начинается выделение возбудителя, а после выздоровления вирус сохраняется в организме ещё на протяжении 2–4 месяцев. Сложность окончательного устранения возбудителя болезни заключается в его способности к длительному сохранению во внешней среде и возможности постоянной циркуляции в одном комплексе между различными половозрастными группами птиц. Основным элементом защиты птиц от БН является иммунопрофилактика, основанная на применении вакцин, которые содержат инактивированный штамм вируса БН (ВБН). **Цель** – оптимизация параметров инактивации актуального штамма Н ВБН формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при температурных условиях 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С.

Материалы и методы. В работе использовали вирусосодержащую суспензию штамма Н ВБН с исходной биологической активностью $10,75 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, выращенного культивированием в 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах.

Результаты. После введения испытуемых инактивированных суспензий ВБН при разных температурных режимах и концентрациях инактиванта у привитых птиц на 16-е сутки в сыворотках крови обнаружение антител к ВБН в среднегеометрических титрах составило не ниже 1 : 63 в реакции торможения гемагглютинации, что дает возможность считать исследуемые инактивированные суспензии антигенно активными.

Заключение. Установлены оптимальные параметры режима инактивации (конечная концентрация, температура и время инактивации) штамма Н ВБН. Процесс инактивации в условиях температуры $37 \pm 0,5$ °С с концентрациями инактиванта 0,01, 0,025, 0,05, 0,1% длится до 72, 22, 18, 12 ч соответственно. Процесс инактивации в условиях при температуре 20 ± 2 °С с концентрациями инактиванта 0,05, 0,1% длится до 22 и 18 ч соответственно.

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла; штамм; инактивация; формальдегид; температура

Для цитирования: Джекебеков К.К., Асанжанова Н.Н., Нурпейсова А.С., Рыскельдинова Ш.Ж., Абсатова Ж.С., Абай Ж.С., Шаяхметов Е.А., Омуртай А.Д., Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Шораева К.А., Закарья К.Д. Выбор эффективного режима инактивации вируса *Pseudopestis avium* (Paramyxoviridae: Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1) для изготовления вакцины против болезни Ньюкасла. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 124–131. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-163> <https://elibrary.ru/ijfbfc>

Для корреспонденции: Абай Жандос Сайлаубекулы, магистр биол. наук, младший научный сотрудник, Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, пгт. Гвардейский, Жамбылская обл., Казахстан. E-mail: abai.zhandos15@gmail.com

Участие авторов: Все авторы внесли равный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счет финансирования по проекту «Разработка, внедрение инактивированной вакцины против болезни Ньюкасла и инактивированной ассоциированной вакцины против болезни Ньюкасла и гриппа птиц» КН МОН РК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен комиссией по биологической этике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (протокол № 1 от 20.01.2021).

Поступила 04.02.2023

Принята в печать 04.04.2023

Опубликована 30.04.2023

Selection of conditions for effective inactivation of *Pseudopestis avium* virus (Paramyxoviridae: *Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) for the production of a Newcastle disease vaccine

Kuanish K. Jekebekov, Nurika N. Assanzhanova, Ainur S. Nurpeisova, Sholpan Zh. Ryskeldinova, Zharkinay S. Absatova, Zhandos S. Abay, Yeraly A. Shayakhmetov, Alisher D. Omurtay, Sabina U. Moldagulova, Elina Zh. Kalimolda, Sandugash O. Sadikalieva, Kamshat A. Shorayeva, Kunsulu D. Zakarya

Research Institute for Biological Safety Problems, 080409, Gvardeisky urban-type settlement, Zhambyl Region, Kazakhstan

Introduction. Newcastle disease (ND) is classified as especially dangerous pathogen. Its primary source is an infected or recovered bird. The virus shedding begins just in a day after infection, and virus remains in the body for another 2-4 months after the recovery. The complexity of the final elimination of the causative agent of the disease lies in its ability for long-term preservation in the external environment and the possibility of constant circulation in one complex between groups of birds of different sex and age. Therefore, the main element of protecting birds from ND is immunoprophylaxis that is based on vaccines containing an inactivated ND virus (NDV).

The aim of the work – is to optimize the parameters of inactivation of the NDV actual strain H with formaldehyde at final concentrations of 0.01, 0.025, 0.05, and 0.1% under temperature conditions of 20 ± 2 and 37 ± 0.5 °C.

Materials and methods. We used a virus-containing suspension of the NDV strain H with an initial biological activity of $10.75 \lg \text{EID}_{50}/\text{cm}^3$ grown by cultivation in 10-day-old developing chick embryos.

Results. On the 16th day after the administration of the tested suspensions of NDV inactivated at different temperatures and concentrations of the inactivant, the geometric mean titers of antibodies to NDV in sera of vaccinated birds were at least 1 : 63 in the hemagglutination inhibition reaction, indicating that the studied inactivated suspensions were antigenically active.

Conclusion. The optimal parameters of the inactivation mode (final concentration, temperature and time of inactivation) of the NDV strain H were established. The inactivation process at 37 ± 0.5 °C with inactivant concentrations of 0.01, 0.025, 0.05, and 0.1% lasts up to 72, 22, 18, and 12 hours, respectively. The inactivation process at 20 ± 2 °C with inactivant concentrations of 0.05 and 0.1% lasts up to 22 and 18 hours, respectively.

Keywords: Newcastle disease virus; strain; inactivation; formaldehyde; temperature

For citation: Jekebekov K.K., Assanzhanova N.N., Nurpeisova A.S., Ryskeldinova Sh.Zh., Absatova Zh.S., Abay Zh.S., Shayakhmetov Ye.A., Omurtay A.D., Moldagulova S.U., Kalimolda E.Zh., Sadikalieva S.O., Shorayeva K.A., Zakarya K.D. Selection of conditions for effective inactivation of *Pseudopestis avium* virus (Paramyxoviridae: *Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) for the production of a Newcastle disease vaccine. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 124-131 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-163> <https://elibrary.ru/ljfbfc>

For correspondence: Zhandos S. Abay, Master (Biol.), Junior Researcher, Research Institute for Biological Safety Problems, 080409, Gvardeisky urban-type settlement, Zhambyl Region, Kazakhstan.
E-mail: abai.zhandos15@gmail.com

Information about the authors:

Jekebekov K.K., <https://orcid.org/0000-0002-7801-6198>
Assanzhanova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-7267-3931>
Nurpeisova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7039-5621>
Ryskeldinova Sh.Zh., <https://orcid.org/0000-0002-9578-5140>
Absatova Zh.S., <https://orcid.org/0000-0003-0510-5496>
Abay Zh.S., <https://orcid.org/0000-0003-1822-1437>
Shayakhmetov Ye.A., <https://orcid.org/0000-0002-4486-3188>
Omurtay A.D., <https://orcid.org/0000-0002-9331-5161>
Moldagulova S.U., <https://orcid.org/0000-0002-8353-1629>
Kalimolda E.Zh., <https://orcid.org/0000-0003-4376-7992>
Sadikalieva S.O., <https://orcid.org/0000-0003-4953-3628>
Shorayeva K.A., <https://orcid.org/0000-0001-8777-8453>
Zakarya K.D., <https://orcid.org/0000-0003-2186-7706>

Contribution: All authors made an equal contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Funding. The research was funded by the project "Development, implementation of an inactivated vaccine against Newcastle disease and an inactivated associated vaccine against Newcastle disease and avian influenza" of the CS MES RK.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Commission on Biological Ethics of the Research Institute for Biological Safety Problems (protocol No. 1 dated January 20, 2021).

Received 04 February 2023

Accepted 04 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Болезнь Ньюкасла (БН, лат. *Pseudopestis avium*) – инфекционное заболевание, поражающее многие виды диких и домашних птиц, вирионы которого представляют собой оболочечный вирус диаметром около 200–300 нм. Геном вируса представлен несегментированной одноцепочечной отрицательной РНК, кодирующей шесть основных генов вируса: нуклеокапсид (N), матричный белок (M), фосфопротеин (P), гибридный белок (F), гемагглютинин-нейраминидазный белок (HN) и большой полимеразный белок (L) [1].

БН является эндемическим заболеванием во многих странах мира, в том числе Республике Казахстан, и легко распространяется различными путями. В Российской Федерации за 2022 г. было зафиксировано 8 вспышек БН на территории Забайкальского края, Владимирской и Ростовской областей.

В Республике Казахстан в последние годы болезнь регистрировалась в Зерендинском, Буландынском и Целиноградском районах Акмолинской области, а также в Кызылжарском, Жамбылском, Мамлютинском районах Северо-Казахстанской области [2, 3]. Болезнь относится к категории особо опасных, для купирования неблагоприятного эпизоотического очага всё поголовье больной и подозреваемой в заболевании и заражении птицы подвергается ликвидации путём сжигания. Такие меры свидетельствуют о высокой вредоносности болезни с серьёзным экономическим ущербом [2–4].

Основным источником инфекции БН является инфицированная и переболевшая птица, которая способна выделять вирус при дыхании, через снесённые яйца и все выделения организма. Всего через сутки после инфицирования начинается выделение возбудителя, а после выздоровления вирус сохраняется в организме ещё на протяжении 2–4 месяцев. Чаще всего БН проявляется в виде эпизоотии, имеет определённую периодичность и склонность к летне-осеннему сезону. Устойчивость вируса БН (ВБН) к действию физических и химических факторов зависит от наличия белка и рН среды [5–7]. Вирус устойчив при рН в диапазоне 2,0–10,0, в высушенных органах при температуре 17–18 °С сохраняется до 2 лет, в птичниках в зимнее время – до 140 дней, летом – до 7 дней. Эта сезонность, в свою очередь, связана с активизацией хозяйственной деятельности и увеличением поголовья птицы в это время. Однако в промышленных хозяйствах могут формироваться стационарные очаги заболевания, связанные с гигиеническими недостатками в текущей си-

стеме выращивания, с которыми трудно бороться [8].

Сложность окончательного устранения возбудителя болезни заключается в его способности к длительному сохранению во внешней среде и возможности постоянной циркуляции в одном комплексе между различными половозрастными группами птиц [8, 9].

Во многих странах основным элементом защиты птиц от БН является иммунопрофилактика, основанная на применении вакцин, которые содержат инактивированный штамм ВБН. К этой группе относятся вакцины Nobilis Paramyxo P201, Colombovac PMV (Голландия), Paramixovacol (Румыния), Salmovir (Польша), Hpraviar (Испания) [2–4].

На введение инактивированных вакцин против БН у птицы вырабатывается однородный продолжительный иммунитет. При этом введение инактивированного антигена не вызывает иммунодепрессии, отсутствует репликация вирусов, т.е. исключаются основные факторы негативного влияния вакцинации на организм [10–12].

Согласно данным литературы, для инактивации ВБН в мире используются различные химические соединения, среди которых наибольшее распространение нашли формальдегид, бета-пропиолактон (БПЛ) и димер этиленмина (ДЭИ) [8–11]. Инактивирующее действие этих препаратов нацелено на генетический материал возбудителей [13–21].

Однако БПЛ в связи с высокой стоимостью экономически не выгоден в масштабном производстве вакцины [13, 14]. Использование ДЭИ требует строгого соблюдения температурно-временного режима инактивации вируса, и его сбой могут привести к неполной инактивации, в связи с чем минимально рекомендуемое время с применением ДЭИ составляет около 30 ч. В целях сокращения времени инактивации при использовании ДЭИ повышение концентрации инактиванта и температуры реакционной среды заметно ускоряет процесс инактивации вируса. Но это в свою очередь может привести к снижению иммуногенной активности вакцинного препарата [14, 21].

Формальдегид в качестве инактиванта в сравнении с БПЛ отличается доступной себестоимостью, а в сравнении с ДЭИ может инактивировать вирус с сохранением доменов, связанных с проникновением вируса, и, более того, не влияет на антигенность вируса [19–21].

При использовании формальдегида в качестве инактиванта необходимо соблюдать температурно-временной режим. Данные литературы свидетельствуют

о том, что определение эффективной концентрации инактиванта и времени инаktivации остаётся одним из актуальных вопросов в производстве эффективных вакцин против БН [14].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования является оптимизация параметров инаktivации актуального штамма Н ВБН формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при условиях температуры 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С.

Материалы и методы

Для исследования в работе использовали вирусосодержащую суспензию (ВСС) штамма Н ВБН с исходной биологической активностью $10,75 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, выращенного культивированием в 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

Инаktivацию вируса проводили с использованием химического соединения формальдегида в различных конечных концентрациях (0,01, 0,025, 0,05 и 0,1%) при температурах 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С в течение 72 ч. Параллельно в качестве сравнительного исследования без добавления формальдегида проводили тепловую инаktivацию вирусосодержащего материала при температурах 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С в течение 72 ч, что являлось контролем.

Для изучения кинетики инаktivации вируса проводили периодический отбор проб в течение 72 ч через каждые 4, 6 и 12 ч. Для нейтрализации формальдегида в ВСС добавляли 25% раствор тиосульфата натрия.

Полноту инаktivации проверяли методом трех последовательных пассажей на 10-суточных РКЭ при введении по 0,2 мл обработанной формальдегидом ВСС, а затем в следующих двух пассажах неразведённой аллантоисной жидкости из предыдущего пассажа.

Антигенную активность инаktivированной суспензии проверяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Иммунизация птиц проводилась с использованием полностью инаktivированной вирусной суспензии ВБН. У однократно привитых цыплят через 16 суток после иммунизации инаktivированной суспензией отбирали кровь и определяли уровень накопления антител в РТГА.

Авирулентность инаktivированной суспензии проверяли на 30-суточных цыплятах живой массой не ниже 100 г из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям птиц. Иммунизацию цыплят осуществляли внутримышечным введением инаktivированной суспензии объемом 2,5 мл в область груди. За привитой птицей вели ежедневное клиническое наблюдение с учётом возможных патологий общего и местного характера, напоминающих признаки БН. В случае отсутствия признаков болезни вирус считали инаktivированным.

Биологическую активность вирусного материала определяли титрованием на 10-суточных РКЭ по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывали по методу Риды–Менча выраженным в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Эмбрионы инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. В аллантоисной жидкости после каждого

пассажа определяли наличие гемагглютининов с помощью микрометода реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 1% взвеси эритроцитов петуха [22].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета программ GraphPad Prism 8. Полученные данные подвергали статистическому анализу с использованием критерия Стьюдента, считая их достоверными при $p < 0,05$ [23].

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен комиссией по биологической этике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (протокол № 1 от 20.01.2021).

Результаты

Одной из главных проблем получения высокоэффективных инаktivированных вакцин является выбор наиболее оптимального способа инаktivации вируса, обеспечивающего необратимое повреждение его репликативного механизма при полном сохранении исходной антигенной структуры.

Для проверки эффективности инаktivированного воздействия формальдегида в отношении штамма ВБН устанавливали параметры инаktivации вируса. Результаты исследований кинетики инаktivации ВБН в разной конечной концентрации формальдегида при температурном режиме инаktivации $37 \pm 0,5$ °С оценивали по кривым инаktivации, представленным на **рис. 1**.

По данным **рис. 1** видно, что скорость инаktivации вируса была пропорциональна концентрации препарата в вирусосодержащей жидкости и времени его воздействия при использовании в качестве инаktivанта формальдегида в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1%. Полная потеря инфекционной активности ВБН при инаktivации формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при температуре $37 \pm 0,5$ °С наступает на 72, 22, 18 и 12-й час соответственно.

Эффективность инаktivированного воздействия формальдегида в вышеуказанных концентрациях с продолжительностью инаktivации 72 ч при температуре 20 ± 2 °С и рН реакционной среды 7,2–7,4 представлена на **рис. 2**.

Согласно исследованиям (**рис. 2**), полная потеря инфекционной активности ВБН при инаktivации формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при температуре 20 ± 2 °С наступает на 72, 60, 22 и 22-й час соответственно.

Результаты исследований термоинаktivации (сравнительный контроль), представленные на **рис. 1** и **2**, свидетельствуют о том, что ВБН снижает свою инфекционную активность при нагревании до $37 \pm 0,5$ °С в течение 72 ч на $4,05 \pm 0,16 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, а при температуре 20 ± 2 °С – только на $1,05 \pm 0,16 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

В **табл. 1** представлены результаты определения антигенной активности в РГА после инаktivации формальдегидом при разных температурных режимах и концентрациях инаktivанта в сравнении с контролем.

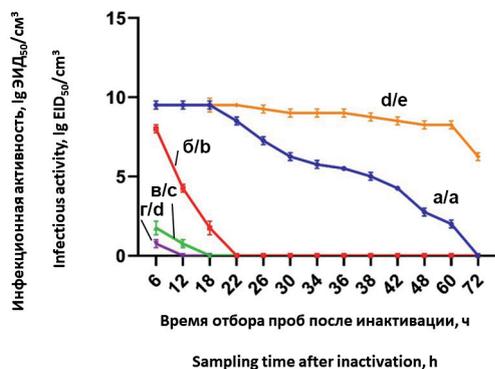


Рис. 1. Кинетика инактивации вируса болезни Ньюкасла в конечной концентрации формальдегида 0,01% (а), 0,025% (б), 0,05% (в) и 0,1% (г) и сравнительного контроля (д) без добавления формальдегида (тепловая инактивация вирусосодержащего материала) при температурном режиме инактивации $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fig. 1. Kinetics of NDV inactivation at a final formaldehyde concentration of 0.01% (a), 0.025% (b), 0.05% (c) and 0.1% (d) and control (e) without addition formaldehyde (thermal inactivation of virus-containing material) at an inactivation temperature regime of $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

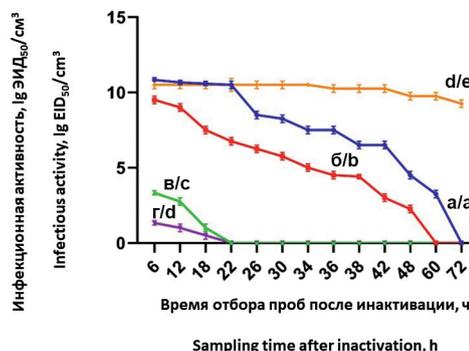


Рис. 2. Кинетика инактивации вируса болезни Ньюкасла в конечной концентрации формальдегида 0,01% (а), 0,025% (б), 0,05% (в) и 0,1% (г) и сравнительного контроля (д), без добавления формальдегида (тепловая инактивация вирусосодержащего материала) при температурном режиме инактивации $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fig. 2. Kinetics of NDV inactivation at a final formaldehyde concentration of 0.01% (a), 0.025% (b), 0.05% (c) and 0.1% (d) and control (e) without addition formaldehyde (thermal inactivation of virus-containing material) at an inactivation temperature regime of $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Таблица 1. Антигенная активность в реакции гемагглютинации после инактивации формальдегидом при разных температурных режимах и концентрациях инактиванта в сравнении с контролем

Table 1. Antigenic activity in RHA after formaldehyde inactivation at different temperatures and concentrations of the inactivant in comparison to the control

Продолжительность инактивации, ч Duration of inactivation, h	Концентрация инактиванта и температурный режим Inactivant concentrations and temperature conditions								Контроль Control	
	0,01%		0,025%		0,05%		0,1%			
	$37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	$20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	$20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	$20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	$20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$	$20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
6	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024
12	1 : 1024	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
18	1 : 1024	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
22	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
26	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
30	1 : 512	1 : 1024	1 : 256	1 : 1024	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
34	1 : 512	1 : 1024	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 1024	1 : 1024
36	1 : 512	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 1024	1 : 1024
38	1 : 512	1 : 512	1 : 128	1 : 512	1 : 64	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 1024	1 : 1024
42	1 : 512	1 : 512	1 : 128	1 : 512	1 : 64	1 : 128	1 : 64	1 : 128	1 : 512	1 : 1024
48	1 : 512	1 : 256	1 : 128	1 : 128	1 : 64	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 512	1 : 1024
60	1 : 256	1 : 256	1 : 128	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 64	1 : 64	1 : 512	1 : 1024
72	1 : 256	1 : 256	1 : 64	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 32	1 : 64	1 : 512	1 : 1024

Также в целях определения антигенной активности инактивированной суспензии ВБН у однократно привитых цыплят через 16 суток после иммунизации инактивированной суспензией отбирали сыворотку крови и определяли уровень накопления антител в РТГА. Результаты представлены в **табл. 2**.

Данные, представленные в **табл. 2**, показывают, что после введения испытуемых инактивированных суспензий ВБН при разных температурных режимах и концентрациях инактиванта у привитых птиц на 16-

е сутки в сыворотках крови обнаружение антител к ВБН в среднегеометрических титрах (СГТ) составило не ниже 1 : 63 в РТГА, что дает возможность считать исследуемые инактивированные суспензии антигенно активными [8].

Авирулентность инактивированных вирусосодержащих суспензий проверяли на 10-суточных РКЭ трехкратным пассированием материала с последующей постановкой РГА. В результате в РГА не выявлена гемагглютинация ВБН, и поэтому исследуе-

Таблица 2. Уровень накопления антител в реакции торможения гемагглютинации у однократно привитых цыплят через 16 суток после иммунизации инактивированной суспензией**Table 2. The level of accumulation of antibodies in hemagglutination inhibition assay (HIA) in single-vaccinated chickens on day 16th after immunization with inactivated suspension**

Продолжительность инактивации, ч Duration of inactivation, h	Концентрация инактиванта и температурный режим Inactivant concentrations and temperature conditions							
	0,01%		0,025%		0,05%		0,1%	
	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C
12	–	–	–	–	–	–	179,59	–
18	–	–	–	–	201,59	–	160	–
22	–	–	100,79	–	179,59	129,9	142,54	139,3
60	–	–	89,79	113,13	126,99	98,49	113,14	105,6
72	71,27	113,13	89,79	97,52	71,27	80	63	80

Таблица 3. Результаты определения безвредности/ареактогенности инактивированных суспензий вируса болезни Ньюкасла после трехкратного пассажа**Table 3. The results of assessment of the safety/reactogenicity of inactivated NDV suspensions after the triple administration**

Суспензия Suspension	Выживаемость, дни наблюдения Survival, observation days										Местная реакция Local reaction	Тканевая реакция на месте введения Tissue reaction at the injection site	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Инактивированная суспензия ВБН-1 Inactivated suspension NDV-1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	---	---
Инактивированная суспензия ВБН-2 Inactivated suspension NDV-2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	---	---
Инактивированная суспензия ВБН-3 Inactivated suspension NDV-3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	---	---

Примечание. Числитель – количество павших птиц; знаменатель – общее количество птиц; «+» – реакция незначительная (единичное дискретное разрастание волокнистой соединительной ткани белого цвета диаметром 2,0–2,5 мм); «–» – отсутствие реакции.

Notes. Numerator is the number of dead birds; denominator is the total number of birds; + reaction is insignificant (single discrete growth of fibrous connective tissue of white color, with a diameter of 2.0–2.5 mm; – no reaction.

мые образцы являются ареактогенными для 10-суточных РКЭ.

По результатам контроля безвредности/реактогенности и авирулентности испытуемых инактивированных суспензий ВБН после трехкратного пассажа в течение 10 суток после введения у привитых птиц каждой группы не отмечалось клинических признаков заболевания (депрессия, потеря чувствительности, синюшность видимых слизистых оболочек, гребня и серёжек и др.), а также гибели птиц. На месте введения испытуемого материала не отмечалось признаков воспаления. У некоторых птиц наблюдалась местная реакция в виде припухлости, которая полностью рассосалась в течение 3–5 дней после введения испытуемого образца (табл. 3).

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что введение испытуемых инактивированных суспензий ВБН не вызывает гибель 30-суточных цыплят, подопытные птицы весь срок наблюдения оставались клинически здоровыми и живыми без местной и тканевой реакции на месте введения испытуемого образца.

Обсуждение

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы показывает, что формальдегид является одним из широко используемых инактиваторов для по-

давления инфекционной активности вирусов [24, 25]. Он инактивирует вирусы благодаря высокой реакционной способности в отношении белков и нуклеиновых кислот. При взаимодействии с нуклеиновой кислотой формальдегид вступает в реакцию с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых оснований, а также нарушает водородные связи, обеспечивающие вторичную структуру компонента вируса. Формальдегид на определенных этапах воздействия разрушает источник инфекционности вирусов – нуклеиновую кислоту – и сохраняет при этом его антигенный фонд, белковую оболочку [26, 27].

Следовательно, скорость инактивации нуклеиновой кислоты будет зависеть от скорости проникновения вещества через белковую оболочку вирусной частицы. Поэтому при реакции формальдегида с вирусом скорость инактивации снижается с увеличением длительности обработки [28].

Эффективность инактивирующего воздействия формальдегида по отношению к ВБН в разных концентрациях инактиванта с продолжительностью инактивации 72 ч при разном температурном режиме показало, что при использовании 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% формальдегида полная потеря инфекционной активности вируса при температуре реакционной среды 37 ± 0,5 °C

происходит до 72, 22, 18 и 12 ч соответственно с сохранением антигенной активности 1 : 512 в РГА и СГТ не ниже 1 : 63 в РТГА. Процесс инактивации в условиях температуры 20 ± 2 °С с 0,01 и 0,025% раствором формальдегида длится до 72 ч, тогда как повышение концентрации инактиванта до 0,05 и 0,1% снижало время самого процесса инактивации до 22 ч. Эта тенденция прямой зависимости снижения инфекционной активности от концентрации инактиванта наблюдалась в аналогичных исследованиях [29], где формальдегид в конечной концентрации 0,05 и 0,1% при температуре 20 ± 2 °С инактивирует ВБН в течение 42 и 30 ч соответственно. Повышение температуры до $37 \pm 0,5$ °С при указанных концентрациях укорачивает продолжительность инактивации до 32 и 24 ч соответственно.

Полученные данные показывают, что с увеличением концентрации формальдегида до 0,1%, а также повышением температуры инактивации до $37 \pm 0,5$ °С устанавливаются оптимальные параметры процесса инактивации ВБН.

Контрольные исследования без воздействия формальдегида при температуре $37 \pm 0,5$ °С показали, что в течение 72 ч не происходит полной инактивации вируса, снижение инфекционной активности ВБН было только на $4,05 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, а при комнатной температуре (20 ± 2 °С) – на $1,05 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, антигенная активность составила от 512 до 1024, что подтверждается данными других авторов [29, 30].

Анализируя потерю инфекционной активности с сохранением антигенной активности ВБН штамма Н, при изучаемых условиях инактивации формальдегидом для дальнейших исследований по конструированию вакцинных препаратов наиболее эффективными являются его рабочие концентрации 0,05 и 0,1% с температурой реакционной среды $37 \pm 0,5$ °С, при которых продолжительность инактивации составляет 18 и 12 ч соответственно. Аналогичные результаты были получены китайскими учёными J. Zhao и соавт. при разработке инактивированной бивалентной вакцины против БН и гриппа птиц H_9N_2 [31].

Заключение

Таким образом, в результате проведения исследований по оптимизации параметров инактивации ВБН было установлено, что наиболее эффективными для инактивации ВБН являются рабочие концентрации формальдегида 0,05 и 0,1% с температурой реакционной среды $37 \pm 0,5$ °С, при которых продолжительность инактивации составляет 18 и 12 ч соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

- Lamb R., Parks G. *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1449–96.
- Болезнь Ньюкасла; 2020. Available at: <https://eldala.kz/novosti/zerno/2446-padezh-domashnej-pticy-v-akmolinskoj-oblasti-mozhet-byt-svyazan-s-boleznyu-nyukasla>
- Карантин из-за вспышки болезни Ньюкасла; 2018. Available at: <https://inbusiness.kz/ru/last/v-odnom-iz-sel-sko-vveden-karantin-iz-za-vspyshki-bolezni-n>
- Болезнь Ньюкасла зафиксирована в Казахстане; 2019. Available at: <https://kaztag.kz/ru/news/bolezni-nyukasla-zafiksirovana-v-kazakhstan>
- Singh R.K., Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R., Natesan S., Khandia R., et al. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies – a comprehensive review. *Vet. Q.* 2019; 39(1): 26–55. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1580827>
- Diel D.G., da Silva L.H., Liu H., Wang Z., Miller P.J., Afonso C.L. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(8): 1770–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.012>
- Kapczynski D.R., Afonso C.L., Miller P.J. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2013; 41(3): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
- Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech.* 2000; 19(2): 443–62. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1231>
- Bello M.B., Yusoff K., Ideris A., Hair-Bejo M., Peeters B.P.H., Omar A.R. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. *Biomed. Res. Int.* 2018; 2018: 7278459. <https://doi.org/10.1155/2018/7278459>
- Манукян В.А., Джавадов Э.Д., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Новикова Н.И., Ильина Л.А. Применение ферментативного пробиотика в кормлении цыплят-бройлеров. *Птица и птицепродукты*. 2013; (5): 022–4. EDN: <https://www.elibrary.ru/renzsh>
- Bell J.A., Sundberg J.P., Ghim S.J., Newsome J., Jenson A.B., Schlegel R. A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology*. 1994; 62(4): 194–8. <https://doi.org/10.1159/000163910>
- Mahmoud N.K., El-Deeb A.H., Emar M.M., Abd El-Khalack M.A., Hussein H.A. Genotypes II and VIII-based inactivated Newcastle disease vaccine reduces virus shedding. *Virusdisease*. 2019; 30(3): 453–61. <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00537-2>
- Dimitrov K.M., Afonso C.L., Yu Q., Miller P.J. Newcastle disease vaccines – A solved problem or a continuous challenge? *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
- Dellue I., Verzele D., Madder A., Nauwynck H.J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines*. 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
- Metz B., Kersten G.F., Hoogerhout P., Brugghe H.F., Timmermans H.A., de Jong A., et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(8): 6235–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310752200>
- Fraenkel-Conrat H., Mecham D.K. The reaction of formaldehyde with proteins; demonstration of intermolecular cross-linking by means of osmotic pressure measurements. *J. Biol. Chem.* 1949; 177(1): 477–86.
- Kuykendall J.R., Bogdanffy M.S. Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutat. Res.* 1992; 283(2): 131–6. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90145-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90145-8)
- Permana P.A., Snapka R.M. Aldehyde-induced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. *Carcinogenesis*. 1994; 15(5): 1031–6. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.5.1031>
- Perrin P., Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone. *Biologicals*. 1995; 23(3): 207–11. <https://doi.org/10.1006/biol.1995.0034>
- Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of beta-propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides: implications for the inactivation of viruses. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>
- Aljumaili O.A., Bello M.B., Yeap S.K., Omar A.R., Ideris A. Protective efficacy of inactivated Newcastle disease virus vaccines prepared in two different oil-based adjuvants. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 2020; 87(1): e1–e7. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1865>
- 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(3): 505–14.
- Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. *Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов*. Ленинград; 1971.
- Garnier R., Rousselin X., Rosenberg N. Formaldehyde toxicity – A review. *Inst. Nat. Rechi. Stcur.* 1989; 134: 63–85.

25. Gard S., Lycke E. Inactivation of poliovirus by formaldehyde; analysis of inactivation curves. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 1957; 7(5): 471–82. <https://doi.org/10.1007/BF01241963>
26. Gard S. Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means. *Ann. NY Acad. Sci.* 1960; 83(4): 638–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb40934.x>
27. Легконогих И.П. Влияние инактиваторов на компонентный состав и свойства вируса ящура: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владимир; 1984.
28. Михалишина З.Я., Михалишин В.В., Шубин Л.Н. Иммуногенность противоящурных вакцин, концентрированных сорбцией и замораживанием. В кн.: *Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов научной конференции ВНИИ.* Владимир; 1983: 66–7.
29. Eladaway S.F., El-Bagoury G.F., El-Habbaa A.S., El Mahdy S.S. Evaluation of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine from new isolate compared with imported NDV vaccine. *Benha Vet. Med. J.* 2020; 38(2): 41–6. <http://dx.doi.org/10.21608/bvmj.2020.21635.1148>
30. Jagt H.J., Bekkers M.L., van Bommel S.A., van der Marel P., Schriener C.C. The influence of the inactivating agent on the antigen content of inactivated Newcastle disease vaccines assessed by the in vitro potency test. *Biologicals.* 2010; 38(1): 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.07.006>
31. Zhao J., Yang H., Xu H., Ma Z., Zhang G. Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 avian influenza. *Virol. J.* 2017; 14(1): 56. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0723-7>
13. Dimitrov K.M., Afonso C.L., Yu Q., Miller P.J. Newcastle disease vaccines – A solved problem or a continuous challenge? *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
14. Delrue I., Verzele D., Maddier A., Nauwynck H.J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines.* 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
15. Metz B., Kersten G.F., Hoogerhout P., Brugghe H.F., Timmermans H.A., de Jong A., et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(8): 6235–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310752200>
16. Fraenkel-Conrat H., Mechem D.K. The reaction of formaldehyde with proteins; demonstration of intermolecular cross-linking by means of osmotic pressure measurements. *J. Biol. Chem.* 1949; 177(1): 477–86.
17. Kuykendall J.R., Bogdanffy M.S. Efficiency of DNA-histone cross-linking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutat. Res.* 1992; 283(2): 131–6. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90145-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90145-8)
18. Permana P.A., Snapka R.M. Aldehyde-induced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. *Carcinogenesis.* 1994; 15(5): 1031–6. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.5.1031>
19. Perrin P., Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone. *Biologicals.* 1995; 23(3): 207–11. <https://doi.org/10.1006/biol.1995.0034>
20. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of beta-propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides: implications for the inactivation of viruses. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>
21. Aljumaili O.A., Bello M.B., Yeap S.K., Omar A.R., Ideris A. Protective efficacy of inactivated Newcastle disease virus vaccines prepared in two different oil-based adjuvants. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 2020; 87(1): e1–e7. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1865>
22. 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(3): 505–14.
23. Ashmarin I.P., Vasil'ev N.N., Ambrosov V.A. *Fast Methods of Statistical Processing and Planning of Experiments [Bystrye metody statisticheskoy obrabotki i planirovaniye eksperimentov]*. Leningrad; 1971. (in Russian)
24. Garnier R., Rousselin X., Rosenberg N. Formaldehyde toxicity – A review. *Inst. Nat. Rech. Stcur.* 1989; 134: 63–85.
25. Gard S., Lycke E. Inactivation of poliovirus by formaldehyde; analysis of inactivation curves. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 1957; 7(5): 471–82. <https://doi.org/10.1007/BF01241963>
26. Gard S. Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means. *Ann. NY Acad. Sci.* 1960; 83(4): 638–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb40934.x>
27. Legkonogikh I.P. *Influence of inactivants on the component composition and properties of the foot and mouth disease virus*: Diss. Vladimir, 1984. (in Russian)
28. Mikhailishina Z.Ya., Mikhailishin V.V., Shubin L.N. Immunogenicity of FMD vaccines concentrated by sorption and freezing. In: *Actual Problems of Veterinary Virology: Abstracts of the Scientific Conference of the VNIYa [Aktual'nye problemy veterinarnoy virusologii: tezisy докладov nauchnoy konferentsii VNIYa]*. Vladimir; 1983: 66–7. (in Russian)
29. Eladaway S.F., El-Bagoury G.F., El-Habbaa A.S., El Mahdy S.S. Evaluation of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine from new isolate compared with imported NDV vaccine. *Benha Vet. Med. J.* 2020; 38(2): 41–6. <http://dx.doi.org/10.21608/bvmj.2020.21635.1148>
30. Jagt H.J., Bekkers M.L., van Bommel S.A., van der Marel P., Schriener C.C. The influence of the inactivating agent on the antigen content of inactivated Newcastle disease vaccines assessed by the in vitro potency test. *Biologicals.* 2010; 38(1): 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.07.006>
31. Zhao J., Yang H., Xu H., Ma Z., Zhang G. Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 avian influenza. *Virol. J.* 2017; 14(1): 56. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0723-7>

REFERENCES

1. Lamb R., Parks G. *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1449–96.
2. Newcastle disease; 2020. Available at: <https://eldala.kz/novosti/zerno/2446-padezh-domashnej-pticy-v-akmolinskoj-oblasti-mozhet-byt-svyazan-s-boleznyu-nyukasla> (in Russian)
3. Quarantine due to the Newcastle disease outbreak; 2018. Available at: <https://inbusiness.kz/ru/last/v-odnom-iz-sel-sko-vveden-karantin-iz-za-vspysyki-bolezni-n> (in Russian)
4. Newcastle disease has been recorded in Kazakhstan; 2019. Available at: <https://kaztag.kz/ru/news/bolezni-nyukasla-zafiksirovana-v-kazakhstan> (in Russian)
5. Singh R.K., Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R., Natesan S., Khandia R., et al. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies – a comprehensive review. *Vet. Q.* 2019; 39(1): 26–55. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1580827>
6. Diel D.G., da Silva L.H., Liu H., Wang Z., Miller P.J., Afonso C.L. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(8): 1770–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.012>
7. Kapczynski D.R., Afonso C.L., Miller P.J. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2013; 41(3): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
8. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech.* 2000; 19(2): 443–62. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1231>
9. Bello M.B., Yusoff K., Ideris A., Hair-Bejo M., Peeters B.P.H., Omar A.R. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. *Biomed. Res. Int.* 2018; 2018: 7278459. <https://doi.org/10.1155/2018/7278459>
10. Manukyan V.A., Dzhavadov E.D., Laptev G.Yu., Nikonov I.N., Novikova N.I., Il'ina L.A. The use of an enzymatic probiotic in feeding broiler chickens. *Ptitsa i ptitseproduktu.* 2013; (5): 22–4. EDN: <https://www.elibrary.ru/renzsh> (in Russian)
11. Bell J.A., Sundberg J.P., Ghim S.J., Newsome J., Jenson A.B., Schlegel R. A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology.* 1994; 62(4): 194–8. <https://doi.org/10.1159/000163910>
12. Mahmoud N.K., El-Deeb A.H., Emara M.M., Abd El-Khaleck M.A., Hussein H.A. Genotypes II and VIII-based inactivated Newcastle disease vaccine reduces virus shedding. *Virusdisease.* 2019; 30(3): 453–61. <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00537-2>