



УКРАЇНА

(19) UA (11) 20245 (13) U  
(51) МПК (2006)  
C12N 7/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ШТАМ ВІРУСУ ГРИПУ А /КУРКА/ СИВАШ/02/05 (H5N1) ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОПРЕПАРАТІВ ПРОТИ ПТАШИНОГО ГРИПУ

1

2

(21) u200607985

(22) 17.07.2006

(24) 15.01.2007

(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Бузун Андрій Ігорович, Музика Денис Васильович, Бабкін Михайло Валерійович, Бісюк Іван Юрійович, Стегній Марина Юріївна, Майорова Клавдія Федорівна, Білявцева Олена Анатоліївна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Штам вірусу грипу А/курка/ Сиваш/02/05 (H5N1) для виготовлення біопрепаратів проти пташиного грипу, що зареєстрований у колекції відділу вивчення хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за номером 12/5/2.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології та біотехнології і може бути використана при виробництві вакцини проти високопатогенного грипу птиці (H5N1).

Однією з складових боротьби з високопатогенним грипом птиці є специфічна профілактика сільськогосподарських птахів інактивованими емульгованими вакцинами. Для високої ефективності вакцинації вакцини повинні бути виготовлені з актуальних гомологічних епізоотичних штамів вірусу грипу, які ізолювані в Україні. Використання інактивованих вакцини з гомологічних штамів дасть змогу забезпечити стабільну епізоотичну ситуацію та ветеринарно-санітарне благополуччя території України щодо високопатогенного грипу у птахів. Штам вірусу грипу А/качка крижень/Пенсільванія/10218/84 (H5N2), який є непатогенним для птахів та людини, який використовується для моделювання гриппозної інфекції [патент Российской Федерации № 2163637. Штамм вируса гриппа А/Н5N2/ ГКВ № 2340 птиц для моделирования гриппозной инфекции / Смирнов Ю.А., Липатов А.С. Гительман А.К. Заявл. 15.10.1999; опубл. 27.02.2001]. Штам відрізняється підтипом нейрамінідази, та непатогенністю для птахів та людини.

Штам вірусу грипу А/крячок/Південна Африка/61 є еталонним та використовується для виготовлення діагностикуму [Диагностика вирусных болезней животных: Справочник / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. - М.: Агропромиздат, 1991. - 528с.]. Штам має інший тип нейрамінідази.

В основу корисної моделі поставлено задачу отримати та адаптувати штам вірусу грипу А/Сиваш/ курка/02/05 (H5N1), який є продуцентом антигену для виготовлення біопрепаратів проти пташиного грипу.

Штам проти пташиного грипу А/Сиваш/курка/02/05 (H5N1) виділено на 10-ти добових курячих ембріонах Штам вірусу грипу А/курка/Сиваш/02/05 зареєстрований у колекції відділу вивчення хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за номером 12/5/2.

Заявлений штам А/курка/Сиваш/02/05 схожий з вище переліченими аналогами, але по суті представляє собою новий, оригінальний в антигенному відношенні вірус. Штам відноситься до вірусів грипу А з гемаглютиніном підтипу Н5. Він відрізняється іншим підтипом нейрамінідази, високою патогенністю для птиці, потенційною небезпекою для людини та є епізоотичним штамом вірусу грипу, який викликав епізоотію серед сільськогосподарської птиці в АР Крим в 2005-2006 роках.

Штам характеризується наступними морфологічними, біологічними властивостями.

Морфологічні та культуральні властивості. Характеристика віріону. Віріони розміром 220-280 нм у діаметрі, ікосаедрального типу симетрії, мають ліпопротеїдну оболонку, при температурі 4-24°C адсорбуються на еритроцитах курей, миші, щура, свині, людини, а при 37°C десорбуються з них.

Стійкість до дії зовнішніх чинників та хімічних речовин. Не стійкий до дії розчинників жирів, лугів,

(13) U

(11) 20245

(19) UA

ультрафіолетового опромінення, сонячного світла, температур вище 80°C, Стабілізується у адсорбованому чи ліофілізованому вигляді, особливо у присутності альбуміноподібних білків, при низьких температурах, стійкий у крупнодисперсних аерозолях.

Культуральні ознаки. *In vitro* культивується у 5 пасажах (термін спостереження) на фібробластах ембріонів курей (первинних та перещеплюваних), перещеплюваних культурах клітин нирки мавпи (Vero) та свині (СПЕВ), без додавання трипсину, з утворенням цитопатичного ефекту (утворення вкраплень у цитоплазмі заражених клітин, їхнє округлення та руйнування клітинного моношару), з титрами інфекційної активності  $10\text{--}10^{4.5}$  ТЦД<sub>50/мл</sub>. *In ovo* культивується у пасажах на зародках курей (5-14-добового віку), качок (7-17-добового віку), з проявою летальної дії (ЛД) та накопиченням гемаглютиніну і віріонів у амніотичній та алантоїсній порожнині через 12-96 годин після зараження, з титрами інфекційної активності  $10^{2.0}\text{--}10^{8.5}$  ЕІД<sub>50/мл</sub>. *In vivo* тканинний вірус (вірус-кров) у 70-добових курей викликає типові ознаки класичної чуми птиці через 8-16 годин після внутрішньовенної інюкації (польові спостереження у епізоотичних осередках), індекс патогенності 2,7 (за даними польових спостережень у епізоотичних осередках). Збудник є вірулентним для усіх видів свійської птиці, викликає у інтактних курей та індиків гостре захворювання з високою контагіозністю (60-90 %) та летальністю (до 100 %); у гусей і качок викликає переважно (до 80 % відомих випадків) хронічне захворювання з клінікою ураження нервової системи, з високою контагіозністю і помірною летальністю (до 30 %) за даними польових спостережень у епізоотичних осередках. Індекс нейтралізації гомологічною антисироваткою у ембріональній системі =7,5. Імуногенність за даними епізоотологічних спостережень є високою: титри антигемоглютинінів у сироватках крові у перехворілої птиці (кури) становлять 1:32-1:4096 (польові спостереження у епізоотичних осередках). Протягом 5-ти пасажів у культуральних та 9-ти пасажів у ембріональних системах не втрачає антигенної специфі-

чності. Пасажі у культуральній системі підвищують летальність вірусу для курячих зародків, пасажі у ембріональній системі стабілізують летальність вірусу для курячих зародків. Вірус ізольовано з головного мозку курки, забитої у період гарячки, методом пасажування з очищенням вірусу граничними розведеннями на курячих зародках 5-12-добового віку.

Патогенність для організму. Циркуляцію штаму зареєстровано в популяціях свійської птиці (кури, індики, качки, гуси) присадибних господарств Північного Криму поблизу озера Сиваш у грудні 2005 року. Збудник є вірулентним для зазначених видів свійської птиці, викликає у інтактних курей та індиків гостре захворювання з високою контагіозністю (60-90 %) та летальністю (до 100 %); у гусей і качок викликає переважно (до 80 % відомих випадків) хронічне захворювання з клінікою ураження нервової системи, з високою контагіозністю і помірною летальністю (до 30 %) за даними польових спостережень у епізоотичних осередках. Індекс нейтралізації гомологічною антисироваткою у ембріональній системі =7,5. Імуногенність за даними епізоотологічних спостережень є високою: титри антигемоглютинінів у сироватках крові у перехворілої птиці (кури) становлять 1:32-1:4096 (польові спостереження у епізоотичних осередках).

Приклад.

Визначення гемаглютинаційної активності вірусу. Для цього використовували планшети з лунками у формі літери V, 1 % суспензію еритроцитів півня на фізіологічному розчині. В усі лунки планшету вносили по 25 мкл фосфатного буферу (рН 7,2), в першу лунку вносили 25 мкл екстраембріональної рідини курячих ембріонів, яка містить вірус. Робили двократні послідовні розведення від 1:2 до 1:4096, після чого в усі лунки додавали 25 мкл 1 % еритроцитів. Після 20 хвилин контакту проводили облік реакції за наявності гемаглютинації в лунках планшетів. Встановлено титр  $10 \log_2$  (1:1024).

Отриманий штам доцільно використовувати для виробництва інактивованої вакцини для птиці проти високопатогенного грипу.