



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60431 (13) U
(51) МПК (2011.01)
C12N 7/00
A61K 39/265 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ BOVINAЕ HERPESVIRUS-1 "BHV-1/COW/KHARKIV/2009" ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИН І ДІАГНОСТИКУМІВ

1

2

(21) u201011492

(22) 27.09.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл. № 12, 2011 р.

(72) СТЕГНІЙ БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, КУЧЕРЯ-ВЕНКО РОМАН ОЛЕКСІЙОВИЧ, КУЧЕРЯВЕНКО ВІКТОРІЯ ВІКТОРІВНА, СТЕЦЕНКО ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ, ТРИЗНА ЛАРИСА ПЕТРІВНА

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

(57) Штам bovine herpesvirus "BHV-1/cow/Kharkiv/2009" для виробництва вакцин і діагностикумів, який зберігається за номером 61 в колекції штамів мікроорганізмів лабораторії вірусології ННЦ "Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини" НААНУ: рід Varicellavirus, вид Bovinae herpesvirus-1, родина Herpesviridae.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології і може бути використана при виготовленні вакцин і діагностикумів проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби (ВРХ).

Інфекційний ринотрахеїт - контагіозна вірусна хвороба великої рогатої худоби, може клінічно перебігати у респіраторній, генітальній, кератокон'юнктивальній, нервово-енцефалітній або шкірній формах і вражає тварин будь якої породи, стану та віку. Кожна з цих клінічних форм може проявлятися самостійно або разом з іншими формами. В окремих випадках хвороба перебігає з ознаками артритів, діареї і генералізованої інфекції у телят.

Інфекційний ринотрахеїт завдає значні економічні збитки скотарству України. Вчасна діагностика та вакцинопрофілактика є важливими засобами боротьби проти цього захворювання. Для розробки засобів діагностики та профілактики бажано мати вітчизняні високо імуногенні штами.

В основу корисної моделі поставлено задачу отримати та адаптувати штам bovine herpesvirus «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» для виробництва вакцин і діагностикумів, який є продуцентом протективного та діагностичного антигену для виробництва вакцин і діагностикумів проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби.

Штам інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» виділено з патологічного матеріалу від хворої корови в неблагополучному господарстві.

Штам «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» зберігається за номером 61 в колекції штамів мікроорганізмів лабораторії вірусології ННЦ «Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААНУ: рід Varicellavirus, вид Bovinae herpesvirus-1, родина Herpesviridae. Видова специфічність штаму «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» визначалась в реакції нейтралізації зі специфічними сироватками до вірусу інфекційного ринотрахеїту, вірусу діареї і коронавірусу ВРХ за загальноприйнятою методикою, а також в реакції імунофлуоресценції зі специфічними кон'югатами до вірусу інфекційного ринотрахеїту та вірусу діареї великої рогатої худоби.

Штам інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» характеризується наступними ознаками та властивостями.

Культурально-морфологічні ознаки: віріони округлої форми, діаметр їх 120-180 нм, нуклеїнова кислота - ДНК двохнитчата, мол. м. 92-102 кД.

Вірус культивується в первинних і перещеплюваних культурах клітин нирки вівці, трахеї теляти, коронарних судин теляти. Цитопатичний ефект виявляється через 20-26 годин. Цитопатогенна дія характеризується появою «виноградних грон», що являє собою скупчення округлих клітин і утворення розривів у моношарі, а в подальшому повним його руйнуванням. Титр вірусу становить 7,0-7,5 Іг ТЦД₅₀/см³. Інактивується за температури 56°C через 20 хв., за температури 37°C через 4-7 діб, за температури 22°C через 50 діб. За температури

UA (11) 60431 (13) U

4°C активність вірусу знижується через 30-40 діб на один Ig. Розчин формаліну 1:500 інактивує вірус через 24 години, 1:4000 - через 46, 1:5000 - через 96 годин. Чутливий до жиророзчинників: ацетон, ефір, хлороформ і етиловий спирт інактивують його повністю.

Патогенні властивості. Циркуляцію штаму зареєстровано серед великої рогатої худоби в скарському господарстві Харківської області в 2009 році. Штам патогенний для великої рогатої худоби незалежно від статі та віку, передається аерогенно, статевим і контактним шляхом. Збудник є високо патогенним для великої рогатої худоби, викликає як у дорослих тварин, так і у телят спочатку гостре захворювання, яке пізніше переходить в хронічне.

Антигенні властивості. В організмі теляти утворює віруснейтралізуючі, комплементзв'язуючі та преципітуючі антитіла.

Імуногенність за даними епізоотологічних спостережень є високою: титри в РНГА в сироватках крові перехворілих тварин становлять у корів 1:256-1:1024, у телят 1:64-1:256 (польові спостереження в епізоотичному осередку).

Біотехнологічні властивості. Стандартні для первинних і перещеплюваних клітинних культур.

Основні умови зберігання. Заморожування за температури нижче 20°C, ліофілізація.

Підтримання штаму проводять шляхом репродукції на чутливих культурах клітин.

Штам проявляє характерні ознаки збудника інфекційного ринотрахеїту. Вірус нешкідливий в інактивованій вакцині.

Стабільність властивостей штаму дозволяє використовувати його при виробництві інактивованих вакцин і діагностичних антигенів.

Використання штаму «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» для виготовлення діагностикумів з метою виявлення вірусу інфекційного ринотрахеїту в реакції імуофлуоресценції ілюструється наступним прикладом.

Приклад. Для отримання специфічного флуоресціюючого імуноглобуліну (ФІТЦ-кон'югату) культивування вірусу IPT штаму «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» здійснювали у моношарових культурах перещеплюваних клітин нирки вівці або трахеї теляти, які вирощували в суміші рівних об'ємів середовища 199 та Ігла з додаванням 10 % сироватки ВРХ в бутлях з використанням ролерного апарату. Для інкубування моношару клітин штам «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» в об'ємі 5 см³ з титром 7 Ig ТЦД 50/ см³ розводили в 300 см³ підтримуючого середовища й вносили у 3 дм бутлю. Збір вірусної біомаси проводили на стадії внутрішньоклітинної локалізації вірусу шляхом збільшення концентрації в одиниці об'єму. При цьому підтримуюче середовище зливали, залишаючи в бутлі

одну десяту попереднього об'єму. Бутлі двічі заморожували та відтаювали (за температури мінус 20°C і 37°C). Отриманий таким чином вірус піддавали додатковому концентруванню і очищенню за допомогою ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози 15-53 % і використовували для чотирьох кратної імунізації лабораторних тварин (кроликів або курей) в об'ємі 1 см³ з додаванням 70 % масляного ад'юванту (Montanide ISA70). Отримані сироватки мали титр нейтралізуючих антитіл 7,8-8,7 log₂. Для виділення гамма-глобулінової фракції використовували сульфатно-амонійний метод. Сироватку розводили рівним об'ємом дистильованої води. Насичений розчин сірчаноокислого амонію (75 %) по краплям додавали в сироватку, яка була розміщена на магнітній мішалці (з розрахунку: на 100 см³ сироватки необхідно взяти 115 см³ сульфату амонію) і залишали на одну добу за температури 4°C. Потім центрифугували при 3000 об/хв впродовж 30 хвилин. Надосадкову рідину зливали, а осад розчиняли в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР), об'єм якого становив половину від початкової кількості сироватки. Повторне висолювання проводили таким же чином. Центрифугували при 5000 об/хв впродовж 20 хвилин. Осад ресуспендували в 10 см³ ЗФР, ретельно перемішуючи до отримання гомогенної суміші.

Отриманий об'єм розчиненого глобуліну вносили в колонку з сефадексом марки G-25 або G-50 і проводили елюцію з 5 об'ємами ЗФР. Отримані глобуліни мітили ФІТЦем.

Приєднання ФІТЦу до білку проводили з розрахунку 2,0 мг ФІТЦа на кожні 100 мг білку. ФІТЦ розчиняли в карбонатно-бікарбонатному буфері (виготовленому завчасно з рН 9,0-9,5) і по краплям додавали в розчин глобуліну, ставили в темне місце на дві години за температури 22°C. Потім на спектрофотометрі визначали співвідношення флуорохром - білок (F/P). Якщо показник F/P дорівнював трьом одиницям і нижче, а відсоток білку становив від 0,5 % до 1,0 %, то цей білок використовували для подальшої роботи, а за інших умов проводили розділення на фракції за допомогою гель-хроматографії на сефадексі марки G-50 або Toyopearl 650M.

Очистку кон'югату від надлишків фарбника проводили на колонках з сефадексом марки G-25.

Специфічність і активність флуоресціюючого імуноглобуліну до штаму «BHV-1/cow/Kharkiv/2009» вірусу IPT визначали в реакції імуофлуоресценції за фарбуючим титром і в реакції гасіння флуоресценції.

Таким чином, стабільність властивостей штаму дозволяє використовувати його при виробництві інактивованих вакцин і діагностичних антигенів.