



УКРАЇНА

(19) UA (11) 71207 (13) A

(51) 7 C12N7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) ІЗОЛЯТ BELGER-1 РОДИНА HERPESVIRIDAE, ПІДРОДИНА α -HERPESVIRINAE, ВИД GALLID HERPESVIRUS TYPE 2 ЯК ПРОДУЦЕНТ ПРЕЦИПІТАТНОГО АНТИГЕНУ ВІРУСУ ХВОРОБИ МАРЕКА

1

2

(21) 20031210910

(22) 02.12.2003

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Білокінь Віктор
Степанович, Герілович Антон Павлович, Герман
В'ячеслав Валентинович(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧ-
НОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ(57) Ізолят BelGer-1 родина Herpesviridae, підро-
дина α -Herpesvirinae, вид Gallid Herpesvirus type 2
як продуцент преципітатного антигену хвороби
Марека, що зберігається в лабораторії біотехоло-
гії ІЕКВМ УААН, м. Харків.

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарної вірусології, епізоотології та біотехнологій, може використовуватись для приготування антигенів для діагностики хвороби Марека (ХМ).

Хвороба Марека є важливою проблемою не тільки ветеринарної, а і гуманної медицини. Це робить необхідним покращення діагностичної бази та раціоналізацію схем імунізації тварин з урахуванням спектру циркулюючих штамів герпес-вірусу птиці.

Для діагностики ХМ в умовах виробництва застосовують патоморфологічні методи діагностики - розтин та приготування гістологічних препаратів вісцеральних лімфатичних вузлів.

Ізолят вірусу хвороби Марека (ВХМ) BelGer-1 може бути використаний для накопичення вірусної біомаси при виготовленні діагностичного антигену для детекції антитіл до ВХМ II серотипу в реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) і реакції дифузійної преципітації (РДП), а також імунізації тварин-донорів та одержання позитивних сироваток з преципітатними антитілами до ВХМ II серотипу.

Ізолят BelGer-1 ВХМ було виділено від трупів 150-добової невакцинованої птиці, забитої в стані агонії. В трупах цих курчат знайдені властиві для ХМ морфологічні зміни в паренхіматозних органах. В сироватці крові птиці із неблагополучного гурту виявлені антитіла до вірусу герпесу курей II типу, до вірусу герпесу індиків антитіл не знайдено.

Індикацію ізоляту проведено на первинно трипсинізованій культурі фібробластів SPF - ембріонів курей шляхом послідовних пасажів суспензії патологічного матеріалу. Ідентифікацію проведено на

основі специфічної цитопатичної дії (ЦПД) та результатами серологічних тестів.

Ізолят зберігається в вірусологічному кріобанку лабораторії біотехнології ІЕКВМ УААН. Вірусний ізолят BelGer-1 відноситься до родини Herpesviridae, підродина α -Herpesvirinae, в межах якої є представником некласифікованого виду Gallid Herpesvirus type 2.

Морфологічні особливості вірусу. Репродуктивний цикл вірусу є ідентичним у порівнянні з вірусом герпесу індиків штаму FC-126 та курей штаму SB-1. Віруси репродукуються в ядрі, де проходять стадії віропласту, нуклеоїду, збірку нуклеотида, формування зовнішньої суперкапсидної оболонки. Ізолят представлений ікосаедричними віріонами, типовими для представників підродина α -Herpesvirinae. Нуклеокапсидна спадкова інформація зберігається в вигляді двоспіральної незамкненої молекули ДНК. В лімфоцитарному ядрі вірус має діаметр 150-170 нм, в цитоплазмі епітеліальних клітин пір'яних фолікулів - до 220 нм.

Культуральні властивості. Ізолят BelGer-1 репродукує в первинно трипсинізованих культурах SPF - ембріонів курей, перепілок та перещеплюваної культури фібробластів ембріонів курей (CEF). ЦПД проявляється утворенням специфічних бляшок (фокусів) і "вікон" моношару.

Структура бляшок представлена острівцями рефрактильних круглих клітин (полікаріоцитів). Розміри їх складають 0,2-0,4 мм в діаметрі, округлої або овальної форми. При проведенні послідовних пасажів на SPF - ембріонах курей інфекційний титр вірусу зростає до 1×10^4 ФУО/см³. ЦПД

(13) A

(11) 71207

(19) UA

з'являється на 3 добу інкубації в моношарі клітин SPF - ембріонів курей та ембріонів перепілки.

При зараженні 7-8-добових курячих ембріонів в жовтковий мішок спостерігається загибель 34% ембріонів на 3-6 добу інкубації. У загинувших відмічається розвиток патологічних змін на хоріон-алантоїсній оболонці у вигляді віспин зірчастої форми 1-2мм в діаметрі, набряку органів грудочної порожнини. При подальшому пасажуванні означені вище патологічні явища стають більш вираженими, що призводить до загибелі 50% інфікованих ембріонів.

Вірус антигенно споріднений з вірусом герпесу курей II першого серотипу та вірусом герпесу індиків.

Вірус є слабопатогенним для добових курчат. Тропізм вірусу розповсюджується на продуктивний епітелій пір'яних фолікулів, імунокомпетентних органів, лімфоцити і нервову тканину. За один пасаж активність вірусу зростає в 1,5-3 рази, що обумовлює швидке накопичення його біомаси.

Приклад 1. Вірусовміщуючий матеріал ізоляту BelGer-1 було розмножено в матрасах ємкістю 1500см³ з моношаром фібробластів ембріонів SPF - курей (по 40000ФУО (фокусоутворюючих одиниць) на кожен матрас). Через 4 доби після інфікування моношар клітин було знято, об'єднано та піддано двократному заморожуванню при - 20°C та відтаюванню на водяній бані. Суспензію центрифугували при 1000 обертів за хвилину впродовж 15 хвилин. Концентрування вірусу здійснювали за допомогою 20% розчину поліетиленгліколю марки ПЕГ-6000 з розрахунку 1 частина розчину ПЕГ на 10 частин супернатанту. Після відстоювання в холодильнику (+4°C) протягом 24 годин осад зібрано, надосад знезаражено кип'ятінням. Осад двократно відмито від ПЕГ після струшування в розчині Хенкса центрифугуванням при 800об./хв. протягом 30 хвилин, після чого вірусний антиген

перевірено на інфекційну активність. Титр інфекційної активності ізоляту BelGer-1 складав 2x10⁴ ФУО/см³.

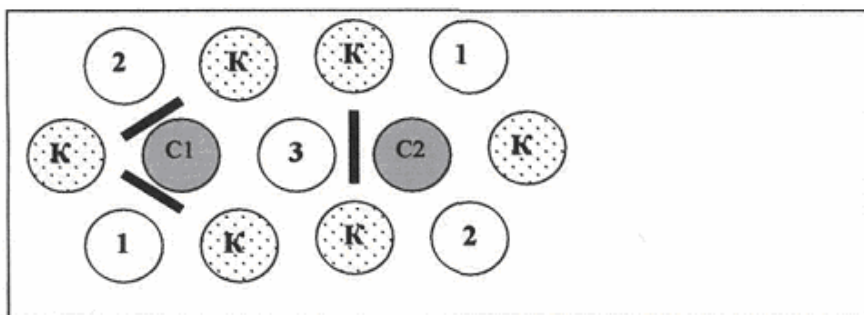
Приклад 2. Для визначення специфічності преципітиногенної активності антигену ізоляту BelGer-1 були приготовані контрольні позитивні антигени штаму SBG вірусу ХМ П серотипу та штаму FC-126 вірусу герпесу індиків за методикою, описаною в прикладі 1. Їх титри після концентрування складали: штаму SBG-1x10⁴ФУО/см³, штаму FC-126 - 2x10⁴ФУО/см³.

Приклад 3. Контрольний зразок антигену виготовлено із культуральної біомаси інтактних фібробластів SPF - ембріонів курки за способом, наведеним в прикладі 1.

Приклад 4. Суспензію концентрованого вірусу ізоляту BelGer-1 було використано в якості антигену в РДП з сироваткою крові, що була відібрана від птиці імунізованої вірусом штаму SBG II серотипу. РДП було поставлено в шарі 1% агарового гелю з лунками по 5мм в діаметрі. Компоненти реакції вносили в об'ємі 0,05см³ мікропіпеткою в порядку, що зображено на рисунку.

Отримані специфічні смуги преципітатного комплексу в агаровій пластині. Як негативний контроль використовували контрольний антиген із інтактною культурою клітин. Для визначення специфічності реакції використали сироватку крові від бройлерів імунізованих моновакциною зі штаму FC-126 в добовому віці. Смуги преципітації з антигеном ізоляту BelGer-1 та штаму SBG не відмічались. Вона була лише з боку антигену штаму FC-126, що також було доказом специфічності процесу преципітації.

Вірусний ізолят BelGer-1 вірусу хвороби Марка має високі репродуктивні властивості і може бути використаний для накопичення вірусної біомаси, її концентрування та очистки для виробництва діагностичних антигенів.



Фіг.