



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40466 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/00  
A61D 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ ГРИПУ ПТИЦІ

1

(21) u200813007  
(22) 10.11.2008  
(24) 10.04.2009  
(46) 10.04.2009, Бюл.№ 7, 2009 р.  
(72) БІЛЯВЦЕВА ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА, UA, ВО-  
РОТІЛОВА НАДІЯ ГРИГОРІВНА, UA  
(73) КРИМСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ НАЦІОНА-  
ЛЬНОГО НАУКОВОГО ЦЕНТРУ "ІНСТИТУТ ЕКС-  
ПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ  
МЕДИЦИНИ", UA

2

(57) Спосіб культивування вірусу грипу птиці на курячих зародках 9-11-добового віку, який полягає в інкубації зародків із наступним їх інфікуванням вірусом грипу птиці, розтином та визначенням ге-маглютинуючої та інфекційної активності хоріон-алантоїсної рідини, який **відрізняється** тим, що інкубування курячих зародків, інфікованих вірусом грипу птиці, проводять при температурі 33 °С.

Спосіб відноситься до біології, біотехнології, ветеринарної вірусології. Може бути використаний при лабораторній діагностиці грипу птиць, для накопичування вірусної біомаси та отримання антигену грипу птиць з подальшим отриманням біологічних препаратів (профілактичних та діагностичних).

Рівень техніки. Впродовж багатьох років інфікування тварин залишалось єдиним методом культивування вірусів, що служило серйозною перешкодою для отримання активних вірусних біопрепаратів у достатній кількості. Використання курячих зародків - важливий крок на шляху розробки вакцин. Ураховуючи відмінне накопичення деяких вірусів цей метод не втратив своєї активності, зокрема для виготовлення біопрепаратів.

Аналоги. Відомі способи культивування вірусу грипу.

1. Культивування на курячих зародках.

Для вірусологічних робіт найбільше підходять яйця білих леггорнів, які мають тонку шкаралупу. Вони повинні бути знесені не пізніше 10 днів, тому що розвиток зародка, не дивлячись на запліднення, сильно затримується. Яйця повинні бути чистими, але не митими. В залежності від методу інфікування яєць їх інкубують у вертикальному (інфікування в алантоїсну, амніотичну порожнину і жовточний міхур) або у горизонтальному (інфікування на хоріон-алантоїсну оболонку) положенні. Усі яйця до інфікування овоскопують на 3-4-й день

інкубації. При цьому виявляють незапліднені яйця, так названі «бовтуни», і яйця з загнблими зародками. Потім на шкаралупі яєць з живими зародками, які розпізнають по червоному кольору кровоносних судин й руху зародка, олівцем відмічають місце інфікування, вільне від кровоносних судин. Незалежно від способу введення матеріалу шкаралупу перед інфікуванням обробляють 70% спиртом, обпалюють над полум'ям і після цього обробляють 2% розчином йоду. Дослідну суспензію інокують 9-10-денним курячим зародкам (не менше п'яти на один зразок) в алантоїсну чи амніотичну порожнину загальноприйнятим методом і інкубують впродовж 72 годин. Інфіковані зародки розміщують у штативи або складують у лотки і ставлять у термостат для подальшого інкубування. Умови інкубації: температура 37,2-37,8°C, волога повітря 60-70%. У процесі інкубації зародки овоскопують один раз за добу через 24 години. Зародки, які загнбли впродовж перших 24 годин, знезаражують, загнбель вважають неспецифічною. Усі зародки (загнблі і живі) через 72-96 годин інкубації охолоджують при температурі 4°C впродовж 12-18 годин і вскривають. Хоріон-алантоїсну рідину кожного зародка окремо відбирають і досліджують на гемаглютинуючу активність в реакції гемаглютинації з 1% зависсю еритроцитів півня. При відсутності гемаглютинації проводять ще 3-5 сліпих пасажів, використовуючи для інфікування

(13) U

(11) 40466

(19) UA

курячих зародків хоріон-алантоїсну рідину попереднього пасажу [1].

2. Культивування вірусу грипу на курячих зародках у гуманітарній медицині.

Яйця білих леггорнів після 10-11 днів інкубації проглядають на овоскопі та відбирають для подальшої роботи ті, в яких знаходиться живий зародок. Шкаралупу над пуюю протирають 70% спиртом і в центрі роблять отвір. Яйце розміщують на овоскопі пуюю доверху й, прокручуючи навколо вертикальної осі, знаходять зародок. Для інфікування використовують шприць об'ємом 1мл з голкою діаметром 0,6мм та довжиною 40мм. Яйце залишається на овоскопі, голку достатньо швидким колючим рухом вводять в порожнину амніона. Голка знаходиться у правильному положенні, якщо зародок рухається разом з нею. 0,2мл інфікованого матеріалу вводять в амніотичну порожнину. Для одночасового інфікування також в порожнину алантоїса вводять голку злегка витаскують і вводять ще 0,2мл матеріалу. Отвір в шкаралупі закривають краплею універсального синтетичного клею. Матеріалом одного зразка інфікують не менше 5 зародків. Інфіковані зародки інкубують 3-4 дні при температурі 33,0°C [2].

Прототип. За ГОСТом 25581-91 «Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики» описано спосіб культивування вірусу грипу птиць на курячих зародках. Інфікуванню підлягають зародки 9-10 добового віку. Контролем є 3-5 незаражених зародків.

Перед інфікуванням зародки овоскопують, відмічають межу пуги. Збоку зародка між кровоносними судинами відмічають ділянку для проколу шкаралупи й інокуляції досліджуемого матеріалу. Шкаралупу з боку пуги і місце проколу дезинфікують та обробляють фламбуванням. У центрі повітряного простору та в місці введення досліджуемого матеріалу роблять пробійником отвір, потім через нього вводять 0,2см<sup>3</sup> вірусного матеріалу на глибину 2-3мм в алантоїсну порожнину. Після інфікування зародків отвір в шкаралупі заливають парафіном. Інфіковані і контрольні зародки інкубують у термостаті протягом 72 годин при температурі 37°C.

У процесі інкубації зародки овоскопують один раз за добу через 24 години. Зародки, які загинули впродовж перших 24 годин, знезаражують, інші витримують у холодильнику при температурі 4°C. Через 72 години інкубації усі зародки охолоджують при температурі 4°C впродовж 12-18 годин, вскривають і досліджують на наявність вірусу грипу [3].

Метою наших досліджень було вдосконалення температурних режимів культивування грипу птиць на курячих зародках, що забезпечує накопичення вірусної біомаси.

Поставлена мета досягається шляхом інкубування курячих зародків при температурі 33°C.

Опис запропонованого способу

Методика культивування вірусу грипу на курячих зародках.

Апаратура, матеріали і реактиви.

Для проведення дослідів застосовують:

термостат, який налаштовують на температуру нагріву 33°C;

центрифугу з частотою обертів 3000об/хв.;

центрифужні стакани ємністю 50см<sup>3</sup>;

овоскоп;

колби конічні скляні ємністю 100см<sup>3</sup> за ГОСТ 1770-74;

пробірки скляні ємністю 10, 15, 20см<sup>3</sup> за ГОСТ 25336-82;

піпетки пастеровські 1, 2, 5 і 10см<sup>3</sup> за ГОСТ 20292-74;

ступки фарфорові;

шприці з голками;

скло кварцове;

натрій хлористий за ГОСТ 4233-77 0,87% розчин (фізіологічний з рН 7,2-7,4);

натрію гідроокис по ГОСТ 4328-77, 3% розчин або інші дезінфікуючі розчини;

натрій лимоннокислий 3-заміщений за ГОСТ 22280-76, 5% розчин;

йод по ГОСТ 4159-79 5% розчин;

антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин);

парафін;

розвиваючі курячі зародки 9-11-добового віку;

еритроцити півнів у фізіологічному розчині, 1%

завись; готуються наступним чином: кров беруть у півнів або курей у віці старше 6 місяців з підкрильцевої вени колбу з фізіологічним розчином у рівних об'ємах з 5% розчином лимоннокислого натру. Одержану кров відмивають фізіологічним розчином, осаджають центрифугуванням з частотою обертів 1500об/хв впродовж 15 хвилин. З осаду відмитих еритроцитів готують 1% суспензію на фізіологічному розчині і зберігають не більш 5 діб при температурі 4°C.

Підготовка дослідів.

Вірусотримуючий матеріал, ізолят збудника грипу Influenza A virus /Ch/Sivash/02/2006/H5N1 [4,5], гомогенізують у стерильному фізіологічному розчині у співвідношенні 1:5 у ступці з кварцовим склом. Гомогенат центрифугують з частотою обертів 2000об/хв. впродовж 15 хвилин. Надосадкову рідину відбирають піпеткою і обробляють антибіотиками для пригнічення сторонньої мікрофлори.

Проведення дослідів.

Для проведення дослідів надосадкової рідини, отриманої після обробки кожного зразка вірусного матеріалу, інфікують не менше 5 зародків 9-11-добового віку. Контролем є 3-5 неінфікованих зародків.

Перед інфікуванням зародки овоскопують, відмічають межу пуги. Збоку зародка між кровоносними судинами відмічають ділянку для проколу шкаралупи й інокуляції досліджуемого матеріалу. Шкаралупу з боку пуги і місце проколу дезинфікують та обробляють фламбуванням. У центрі повітряного простору та в місці введення досліджуемого матеріалу роблять пробійником отвір, потім через нього вводять 0,2см<sup>3</sup> вірусного матеріалу на глибину 2-3мм в алантоїсну порожнину. Після інфікування зародків отвір в шкаралупі заливають парафіном. Інфіковані і контрольні зародки інкубують у термостаті протягом 72-96 годин при температурі 33°C.

У процесі інкубації зародки овоскопують два рази за добу. Зародки, які загинули впродовж перших 24 годин, знезаражують, інші витримують у холодильнику при температурі 4°C. Через 72-96

години інкубації усі зародки охолоджують при температурі 4°C впродовж 12-18 годин і вскривають.

Обробка результатів.

Зразок вважають негативним, якщо у 3-5 пасажах не було виявлено гемаглютинації еритроцитів і патогенної дії вірусу (загибель зародків). При присутності гемаглютинації еритроцитів або загибелі зародків проводять ідентифікацію виділеного вірусу в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) з позитивною сироваткою до вірусу грипу птахів H5N1 [6] з визначенням титру вірусу. РЗГА вважають позитивною, якщо специфічна гриппозна сироватка повністю гальмує гемаглютинуючу активність вірусотримуючого матеріалу не менше 1/4 до 1/8 її гомологічного титру.

Запропонований спосіб дозволяє накопичувати слабо вірулентний вірус грипу птахів шляхом культивування його на курячих зародках при температурі інкубації 33°C з подальшим використанням хоріон-алантоїсної рідини з слабо вірулентним вірусом для отримання біологічних препаратів (діагностичних та профілактичних).

Джерела інформації:

1. Ветеринарная вирусология./В.Н.Сюрин, Р.В.Белоусова, Н.В.Фомина. - М.: Колос, 1984.- 376с.

2. Р.Робинсон, У.Даул и др. Лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний./ Под редакцией проф.Э.Леннета и Н.Шмидт. - М.: «Медицина», 1974. - С.333-349.

3. ГОСТ 25581-91 «Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики».

4. Патент на корисну модель №20245. Штам вірусу грипу «А(курка) Сиваш/02/06(H5N1)» для виготовлення біопрепаратів проти пташиного грипу. Стегній Б.Т., Бузун А.І., Музика Д.В., Бабкін М.В., Бісюк І.Ю., Стегній М.Ю., Майорова К.Ф., Білявцева О.А.

5. Бабкін М.В., Бузун А.І., Стегній Б.Т., Герілович А.П. Депонування штаму «А(курка) СНВаіи/02/06(H5N1)» вірусу пташиного грипу //Між від.тематич.збірник «Ветеринарна медицина», - 2006. - №87. - С.31-34.

6. Патент на корисну модель №31027. Спосіб отримання позитивної контрольної сироватки до вірусу грипу птахів. Білявцева О.А., Воротілова Н.Г., Іонкіна І.Б., Болдирєв А.Д., Стегній Б.Т., Музика Д.В.