



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **26692** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
C12N 7/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) ІЗОЛЯТ ЛІ-2 ЯК ПРОДУЦЕНТ АНТИГЕНУ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ (РОДИНА CORONAVIRIDAE, CORONAVIRUS)**

1

2

(21) u200613927

(22) 27.12.2006

(24) 10.10.2007

(46) 10.10.2007, Бюл. № 16, 2007 р.

(72) Пархоменко Людмила Іванівна, Нестерова  
Лариса Юріївна, Мустафа Аль Раващдех(73) ЛУГАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ

(57) Ізолят ЛІ-2 як продуцент антигену вірусу інфекційного бронхіту (Infection bronchitis virus) курей (родина Coronaviridae, Coronavirus), що зберігається в лабораторії вірусології науково-виробничого центру птахівництва Луганського національного аграрного університету, м. Луганськ.

Корисна модель, що передбачається, відноситься до ветеринарної вірусології, епізоотології та біотехнології, може використовуватися в якості антигену для діагностики коронавірусної інфекції курей.

Інфекційний бронхіт курей (ІБК) - гостре високонконтагіозне захворювання, що характеризується ураженням респіраторного тракту курчат, нирок та репродуктивних органів дорослої птиці, залишається однією з основних причин втрат у птахівництві.

За даними наукової літератури, виділено і ідентифіковано понад 20 серотипів збудника ІБК, кількість яких, в останні роки, збільшується [Борисов О., Хлібова Т., Фролов С., Семененко О. Інфекційний бронхіт курей // Ветеринарна медицина України. - №5. - 1998. - С.28-29].

Два штами вірусу інфекційного бронхіту курей (ВІБК), виділені з трахеї курей 4-7-тижневого віку з респіраторними ознаками, ідентифіковані на основі змін курячих ембріонів, результатів фізико-хімічних тестів, електронної мікроскопії, а також культивування у культурі клітин, мають відмінність від референтних штамів М41 та Н52 ВІБК та позначені як окремі варіанти вірусу ІБК [al Tarcha B, Kojnok J, Varro C. Isolation and characterization of new infectious bronchitis virus variants in Hungary // Acta Vet Hung. - 1990. - Vol.38, №4. - P.287-298].

За молекулярно - генетичним аналізом ізолят SC021202, виділений з нирок курчат, має характерні для коронавірусу птахів морфологічні, фізико-хімічні та аглютинуючі властивості, віднесено до нового варіанту ВІБК, що викликає нефрити [Zhou JY, Zhang DY, Ye JTX, Cheng LQ. Characterization

of an avian infectious bronchitis virus isolated in China from chickens with nephritis // J Vet Med. - 2004. - Vol.51, №4. - P.47-52].

Ізоляти, виділені з трахеї, легень, нирок вакцинованих проти ІБК та хворих на респіраторне захворювання бройлерів ідентифіковані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції як ВІБК та віднесені до серотипу Massachusetts, але за електрофоретичним профілем відрізняються від відомих штамів ВІБК [Escorcia M, Jackwood MW, Lucio B, Petrone VM, Lopez C, Fehervari T, Tellez G. Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997 // Avian Dis. - 2000. - Vol.44, №4. - P.944-947].

Встановлена схожість штаму СТ/7852/97, ізольованого від курей при зниженні несучості та якості яйця, із серотипами Massachusetts, Arkansas та JMK ВІБК. Визначення нуклеотидної послідовності штаму СТ/7852/97 виявило високу нуклеотидну гомологічність зі штамом H-120 (97%) та низьку (62%) - зі штамом Delaware (De/072/92) вірусу ІБК [Wang X, Khan M. Molecular characterization of an infectious bronchitis virus strain isolated from an outbreak in vaccinated layers // Avian Dis. - 2000. - Vol.44, №4. - P.1000-1006].

Штам SAIB3 ВІБК, ізольований з нирок та легень курчат, ідентифікований за результатами цілістатичного тесту, електронної мікроскопії і реакції нейтралізації, має схожість з референтним штамом М41 вірусу ІБК. [Wang HN, Wu QZ, Huang Y, Liu P. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from chickens in Sichuan, China // Avian Dis. - 1997. - Vol.41, №2. - P.279-282].

(19) **UA** (11) **26692** (13) **U**

Для успішної боротьби з хворобою слід використовувати вакцини, які складаються з декілька серотипів, споріднених із варіантними штамами, ізольованими у даному регіоні. Така профілактика створює у птиці тривалий і напружений імунітет до ВІБК.

Ізолят ЛІ-2 ВІБК придатний для накопичення вірусної біомаси, з метою виготовлення антигену для серологічних реакцій (реакції непрямой гемаглютинації, реакції дифузної преципітації, реакції нейтралізації), для імунізації тварин-донорів та одержання позитивних сироваток з антитілами до коронавірусу курей, а також може бути використаний у якості антигену для виготовлення вакцини проти коронавірусної інфекції птахів.

Ізолят ЛІ-2 ВІБК було виділено від загинлої птиці 150-добового віку з наступними патологоанатомічними змінами: збільшення нирок та селезінки, гіперемія легень, оваріосальпінгіт, жовтковий перитоніт. Результати серологічного моніторингу господарства, якому належала птиця, свідчать про циркуляцію вірусу інфекційного бронхіту серед курей.

Індикацію ізоляту ЛІ-2 проводили на курячих ембріонах 9-добової інкубації шляхом послідовних пасажів суспензії патологічного матеріалу, а також при інфікуванні трахеальної культури курчат. Ідентифікацію проводили на основі цитопатогенної дії ізоляту на курячі ембріони, результатів полімеразної ланцюгової реакції, електронної мікроскопії та серологічних досліджень. Вірусний ізолят ЛІ-2 відноситься до родини Coronaviridae, род Coronavirus.

Ізолят зберігається у морозильних шафах при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  у вірусологічній лабораторії науково-виробничого центру птахівництва Луганського національного аграрного університету.

Морфологічні особливості вірусу. Ізолят ЛІ-2 представлений віріонами овальної форми з нерівною поверхнею зовнішньої мембрани, типовими для представників родини Coronaviridae. При негативному контрастуванні в екстраембріональній рідині курячих ембріонів вірус має діаметр від 100 до 171 нм.

Культуральні властивості. Ізолят ЛІ-2 репродукує в курячих ембріонах (КЕ), первинне - трипсинізований культурі фібробластів курячих ембріонів (ФКЕ) та перещеплюваній культурі нирки зеленої мавпи (Vero). У культурі клітин ФЕК цитопатогенна дія (ЦПД) ізоляту ЛІ-2 проявляється деструктивними змінами клітинного моношару після 1-го пасажу через 36 год. після інфікування. У культурі клітин VERO ізолят викликає ЦПД у вигляді генералізованої дрібнозернистої неспецифічної дегенерації-клітин через 96 год. та пригнічення мітотичної активності клітин із збільшенням кількості атипових форм мітозів. Інфекційна активність вірусу після 3-х пасажів у культурі клітин VERO становить  $10^{5.25}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Приклад 1. Ізоляцію та культивування вірусу проводили на КЕ 9-добової інкубації при зараженні на хоріоантоїсну оболонку (ХАО) в об'ємі 0,2 мл. Після інфікування ембріони інкубували в термостаті при  $+37^{\circ}\text{C}$ , вологості 60-70% впродовж 5 діб. Щоденно проводили овоскопію яєць та визначали життєздатність КЕ. Загибель КЕ в перші

24 години після інфікування приймали за неспецифічну. При 1-му пасажі ізолят ЛІ-2 індукував загибель 30% КЕ на 3-4 добу після введення, карликовість 50% КЕ, набряк ХАО, збільшення кількості екстраембріональної рідини, а також гіперемію і крововиливи на тілі 80% ембріонів. Загибель ембріонів супроводжувалась набряковими явищами в органах грудочеревної порожнини. Після адаптації впродовж 3-х пасажів відсоток таких патологоанатомічних змін, як карликовість та набряк хоріоантоїсної оболонки КЕ, інфікованих ізолятом ЛІ-2, збільшився до 100.

Інфекційну активність ізоляту ЛІ-2 визначали за методом Ріда та Менча та виражали у 50% ембріональній інфікуючій дозі (ЕІД<sub>50</sub>). Титр ізоляту ЛІ-2 після 1-го пасажу становив  $10^{6.26}$  ЕІД<sub>50</sub>/0,2 см<sup>3</sup>.

Приклад 2. Патогенність ізоляту ЛІ-2 визначали на курчатах 3-добового віку після 1-го пасажу на КЕ. Інфікування проводили інтратрахеальним методом в об'ємі 0,2 мл. Спостереження за клінічним станом інфікованих курчат та серологічний контроль сироваток крові щодо ВІБК здійснювали впродовж 25 діб у РНГА. Через 7 і 25 діб після інфікування проводили патологоанатомічний розтин курчат. РНГА ставили мікрометодом з використанням еритроцитарного діагностикуму. Титром антитіл щодо ВІБК вважали найбільше її розведення, при якому спостерігалася аглютинація еритроцитів.

Після інфікування ізолятом ЛІ-2 клінічні ознаки захворювання з'явилися через 12 год. у 100% курчат і характеризувалися загальним пригніченням, зниженням апетиту і відмовою від води. Через 24 год. після інфікування, у курчат відмічали важке дихання, хиткість ходи та водянистий пронос. Розвиток клінічних ознак спостерігали впродовж тижня.

За даними серологічного контролю, з 3-ї доби після інфікування у 100% інфікованих курчат виявили антитіла до ВПЯС у титрі 1:16, порівняно з 1-ю добою, коли титр антитіл становив 1:2 (50%) - 1:4 (50%).

При патологоанатомічному розтині курчат через 7 діб після інфікування виявляли дегідратацію та нерівномірне забарвлення скелетних м'язів, скупчення серозного ексудату у трахеї. Розтин курчат, проведений через 25 діб після зараження ізолятом ЛІ-2, не виявив жодних патологічних змін.

Приклад 3. Вплив ізоляту ЛІ-2 на циліарний апарат трахеї вивчали на невакцинованих курчатах 3-добового віку з благополучних щодо інфекційних захворювань птиці господарств з різним рівнем материнських антитіл до ВІБК у сироватці крові. Курчат інфікували інтратрахеальним методом ізолятом ЛІ-2 в об'ємі 0,2 мл. Рівень пиліарної активності оцінювали впродовж 5 діб після інфікування за допомогою ціліостатичного тесту. Для цього, починаючи з 24 год. після інфікування, проводили декапітацію 4-х курчат з кожної групи та препарування трахеї. Після промивання у розчині Хенксу та видалення залишків сполучної тканини, з кожної трахеї нарізали по 10 тонких кілець (3-й, з нижньої і верхньої, та по 4-й з середньої частини трахеї) хірургічними ножицями. Отримані кільця розташовували на предметному склі та перевіряли активність війок трахеї під світловим мікроскопом

при збільшенні окуляра  $\times 10$  і об'єктива  $\times 10$ . Ціліарну активність оцінювали за шкалою від 0 (усі війки рухомі) до 4 (усі війки нерухомі). Для всіх 10 трахеальних кілець від кожної птиці розраховували загальний ціліостатичний бал, який при повному ціліостазі дорівнював 40 та середній арифметичний бал для усіх 4-х курчат з групи. Ціліостатичний бал менше від 20 свідчив про наявність захисту птиці від даного ізоляту вірусу IBK.

У курчат, незалежно від наявності антитіл до ВІБК, через 24 год. після інфікування ізолятом ЛІ-2 спостерігалось уповільнення та повне припинення руху війок трахеї, яке продовжувалося впродовж 3-4 діб.

В групі курчат без материнських антитіл до ВІБ, максимального значення (40,0) ціліостатичний бал досяг на 1-у добу після інфікування, тоді як в групі курчат з материнськими антитілами до ВІБ, повного ціліостазу зареєстровано на 3-у добу після інфікування.

Гістологічні зміни у трахеї, легенях та нирках курчат після інфікування ізолятом ЛІ-2 були визначені в момент, коли ціліостатичний бал дорівнював максимального значення. З цією метою у курчат кожної підгрупи відбирали частину трахеї, легень, нирок, які фіксували у 10% розчині формаліну і заливали у парафін. Отримані зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Оцінку гістологічних змін проводили за допомогою апаратно - програмного комплексу, до складу якого входить мікроскоп Olympus C X 41, цифровий апарат Olympus C 5050 Z, фотоадаптер, плата цифрового кодування відеосигналів та комп'ютер.

У трахеї ізолят ЛІ-2 викликав набряк власної слизової оболонки, відшарування епітелію, збільшення кількості келихоподібних клітин. В легенях виявлено гострий венозний застій та лімфоїдну інфільтрацію перібронхіальної сполучної тканини та власної слизової оболонки бронхів. Гостра застійна гіперемія та лімфоїдна інфільтрація встановлена при гістологічному дослідженні нирок курчат, інфікованих ізолятом ЛІ-2.

Приклад 4. Для визначення гемаглютинуючої активності ізоляту ЛІ-2, після 1-го пасажу на КЕ, була проведена реакція гемаглютинації за температури  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $18-22^{\circ}\text{C}$  та  $37^{\circ}\text{C}$ , безпосередньо після обробки вірусмішучого матеріалу 1% розчином еритроцитів півня. Реакції здійснювали у лунках плексигласових пластин з використанням 2-кратних розведень ізоляту на фізрозчині рН 7,2 в однакових об'ємах (0,2 мл). До кожного розведення додавали по 0,2 мл 1% суспензії еритроцитів півня. Одночасно досліджували алантоїсну рідину неінфікованих КЕ в якості контролю. Облік реакції проводили через 30-40 хв. За титр гемаглютинінів приймали розведення вірусу, яке сприяло прояву інтенсивності реакції у 2 хрести.

За результатами реакції встановлено, що ізолят ЛІ-2 володіє гемаглютинуючою активністю незалежно від температури, титр гемаглютинінів становив 1:16.

Приклад 5. Дослідження ізоляту ЛІ-2 після 1-го пасажу на КЕ щодо аутентичності ВІБК проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Виділені зразки РНК ізоляту було використано для напрацювання кДНК, як матриці у реакції зворотної транскрипції. Реакцію ампліфікації з визначення належності РНК збудника до коронавірусу курей проводили за допомогою системи праймерів, що фланкують 320п.н. ділянку S1 гену. Ампліфікаційний режим включав наступні цикли: ініціальна денатурація ( $95^{\circ}\text{C}$ , 5хв., 1 повторення), денатурація ( $95^{\circ}\text{C}$ , 1хв., 40 повторень), віджиг праймерів ( $56^{\circ}\text{C}$ , 5хв., 40 повторень), елонгація ( $72^{\circ}\text{C}$ , 1хв., 40 повторень), фінальна елонгація ( $72^{\circ}\text{C}$ , 5хв., 1 повторення). Електрофоретичний аналіз результатів проведено при концентрації агарози у гелі 1,5% та силі струму 120В.

За результатами проведеної полімеразної ланцюгової реакції встановлено, що досліджувана РНК ізоляту ЛІ-2 специфічно реагує з системою праймерів S1 на S1 ген вірусу IBK.

Приклад 6. Аналіз білків, що входять до складу ізоляту ЛІ-2 проводили за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі (ПААГ), у порівнянні з вакцинними штамами 4/91, МА-5 та Н-120 ВІБК. З метою очищення ізолят ЛІ-2 попередньо осаджували на 30%-й сахарозній подушці, розчин якої робили на TSE буфері (25mM трис-НCl, 100mM Nad, 1mM EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота), рН7,6) з подальшим концентруванням за допомогою центрифуги MSE Superspeed 65, ротор MSE об'ємом 6х16,5мл. Термін центрифугування складав 1,5 год. за  $t + 5^{\circ}\text{C}$  та 25000об./хв. (76000g). Отриманий вірусний осад ресуспендували у 0,5мл TSE буфері і використовували для електрофорезу. Горизонтальний електрофорез проводили у 2%-му ПААГ у камері LKB 2117 Multiplier II (Швеція), блок постачання LKB 2197 Power supply (Швеція). До вірусного матеріалу додавали буфер в об'ємі 1:1, який включає 0,15M трис-НCl, 1% ДСН (додецилсульфат натрію), 2%  $\beta$ -меркаптоетанол. Після розчину білків впродовж 10хв. за  $t + 18-20^{\circ}\text{C}$ , розчин інкубували 3хв. на водяній бані при  $+100^{\circ}\text{C}$ , потім охолоджували і центрифугували 5хв. при 10000об./хв. Електрофорез проводили у горизонтальних поліакриламідних пластинах розміром 250х125х0,5мм після внесення 6мкл зразків вірусоутримуючого матеріалу. Градієнт пористості гелю на старті складав 4%, на фронті - 22,5%. Фіксацію зразків проводили з використанням 20% трис-Cl-оцтової кислоти протягом 20хв., фарбування - кумассі-бриліантовим синім впродовж 30хв. Оцінку молекулярної ваги білків здійснювали порівняно до стандартних білків [Cytochrom C, Ferritin, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin, BSA], що підвергали електрофорезу одночасно із вірусом.

Електрофорезом визначено, що до складу ізоляту ЛІ-2 та вакцинних (Н-120, Ма-5, 4/91) штамів ВІБ входять білкові фракції з молекулярною масою від 14,5кДа до 155кДа. (Таблиця 1).

Таблиця 1

Молекулярна маса білків польового  
ізоляту ЛІ-2 та вакцинних штамів ВІБ

Штами ВІБ	Молекулярна маса білків (кДа)								
	14,5	25,1	28,8	29,5	62,4	67,0	77,0	99,4	155,0
ЛІ-2	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Н-120	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4/91	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Ма-5	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Для ізоляту ЛІ-2 характерні білкові фракції з молекулярною масою 25,1, 28,8, 67,0 і 77,0кДа. Встановлено, що вакцинні штам Н-120 та Ма-5 ВІБ містять однакові з ізолятом ЛІ-2 фракції білків - 25,1 та 28,8кДа, які за молекулярною масою відповідають внутрішньому мембранному білку М та матричному глікопротеїну Е1.

Вірусний ізолят ЛІ-2 інфекційного бронхіту курей має високі репродуктивні властивості і може бути використаний для накопичення вірусної біомаси, її концентрування та очистки для виробництва діагностичних антигенів та отримання гіперімунних сироваток до корона вірусу курей.