



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **44402** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 1/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) ІЗОЛЯТ ЄН-5/2, ЯК ПРОДУЦЕНТ АНТИГЕНУ ПАРВОВІРУСУ СОБАК (РОДИНА PARVOVIRIDAE, РІД PARVOVIRUS)**

1

(21) u200813172

(22) 13.11.2008

(24) 12.10.2009

(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.

(72) ПАРХОМЕНКО ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА, ІЛІНА
ОКСАНА ВАЛЕРІЙВНА, СТЕГНІЙ БОРИС ТИМО-
ФІЙОВИЧ, КЕЛЕБЕРДА МИКОЛА ІВАНОВИЧ(73) ЛУГАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ(57) Ізолят ЄН-5/2, як продуцент антигену парвові-
русу собак (родина Parvoviridae, рід Parvovirus),

2

що зберігається в лабораторії вірусології Науково-виробничого центру ветеринарної медицини птахівництва Луганського національного аграрного університету, м. Луганськ, який **відрізняється** від відомих парвовірусів собак чутливістю до репродукції у первиннотрипсинізованих культурах клітин фібробластів курячих ембріонів та здатністю утворювати внутрішньоядерні тільця-включення у культурах клітин Vero.

Корисна модель, що передбачається, відноситься до ветеринарної вірусології, епізоотології та біотехнології, може використовуватися для приготування антигену для діагностики та профілактики парвовірусної інфекції собак (Parvovirus infection).

Парвовірусна інфекція є однією із найбільш поширених у світі, в тому числі і в Україні, вірусних хвороб собак. Для профілактики парвовірусної інфекції використовують ряд вакцин, що виготовлені на основі адаптованих до культур клітин атенуйованих штамів і штаму C154. Прорив імунітету обумовлений існуванням різниці у антигенній структурі у різних штамів парвовірусів. Відомо, що циркулюючи серед собак на території Росії штам 13-4 та ізоляти парвовірусів (K3, K1, K2, MB, KB) мають антигенну спорідненість, але й розрізняються за допомогою моноклоіальних антитіл у антигенній структурі [Власов Н.А., Уласов В.И., Черняева И.С., Элизбарашвили Э.И., Вахромеева В.В., Васильев Д.А. Парвовирусы плотоядных и вызываемые ими болезни.-Ульяновск, 2000.-35 с.].

Є повідомлення про наявність нових типів Canine Parvovirus (CPV), які відрізняються за нуклеотидним складом у гені VP 2 та чутливістю до культури клітин фібробластів кішки [V.Martella, A.Cavalli, A. Pratelli, G.Boz/o, M. Camera, D. Buonavoglia, D. Narcisi, M. Tempcsta, C. Buonavoglia. L Canine Parvovirus Mutant Is Spreading in Italy // J. Clin. Microbiol. - 2004.- V. 42(3). -P. 1333-1336].

Деякі автори стверджують, що вірус успішно культивується у клітинній лінії нирки кішки (NLFC)

та собаки (A-72, MDCK), але менш чутливими або нечутливими є культури клітин: фібробластів курячих ембріонів (ФКБ), нирки свині, корів, крольчат, нирки. Одночасно штам R-72, виділений з печінки собаки, адаптували до культур клітин нирки порося, ембріону нирки, гонади кози [Шестопалов А.М., Кисурин М.И., Дурыманов А.Г. Сравнительная характеристика некоторых парвовирусов плотоядных // Вопросы вирусологии, 1998, № 5.- с. 199-204]. Це, головним чином, пов'язано з еволюційною мінливістю збудника, яка призводить до здатності вірусу репродукуватися у різних гетерологічних біосистемах.

Ізолят ЄН-5/2 парвовірусу собак придатний для накопичення вірусної біомаси, з метою виготовлення антигену для серологічних реакцій: реакції непрямой гемаглютинації (РНГА); реакції імунної дифузії (РІД), реакції нейтралізації (РН), для отримання специфічних сироваток шляхом імунізації кролів. Після атенуації може бути використаний у якості вакцинного штаму вірусу.

Ізолят ЄН-5/2 парвовірусу собак був виділений із клінічного матеріалу (кров'яний згусток, кров з антикоагулянтом, змив зі слизових оболонок) нещепленої німецької вівчарки 5-місячного віку із ознаками ураження центральної нервової системи.

Індикацію ізоляту ЄН-5/2 проводили на курячих ембріонах 9 - добової інкубації, перещеплюваній культурі клітин нирки зеленої мавпи (Vero) та первинній культурі ФКЕ впродовж послідовних пасажів суспензії ембріонального матеріалу. Ідентифікацію проводили за результатами полімераз-

(19) **UA** (11) **44402** (13) **U**

ної ланцюгової реакції (ПЛР), електронної мікроскопії, реакції гемаглютинації (РГА) з 1% зависю еритроцитів півня, морської свинки, свині, кішки, реакції нейтралізації (РН) зі специфічною сироваткою щодо ізоляту парвовірусу ЄН-5/2 та у РІД, враховували основні патологоанатомічні зміни у інфікованих курячих зародках, цитопатогенну дію ізоляту на культури клітин Vero та ФКЕ.

Морфологічні особливості вірусу. Ізолят ЄН-5/2 представлений віріонами округлої форми без зовнішньої мембрани, типовий представник родини Parvoviridae. За умов негативного контрастування в екстраембріональній рідині курячих ембріонів вірус має діаметр від 22 до 30 нм.

Культуральні властивості. Ізолят ЄН-5/2 репродукується у курячих ембріонах (КЕ), первинно-трипсинізованій культурі фібробластів курячих ембріонів (ФКЕ) та перещеплюваній культурі нирки зеленої мавпи (Vero). У культурі клітин Vero цитопатогенна дія (ЦПД) ізоляту ЄН-5/2 проявляється деструктивними змінами клітинного моношару через 24 год. після інфікування у вигляді значного заокруглення, вакуолізації клітин та появою внутрішньоядерних тілець-включень. У культурі ФКЕ повну дегенерацію моношару спостерігали через 72 год. після інфікування. Інфекційна активність вірусу у культурі ФКЕ становить $10^{5,25}$ ТЦД_{50/0,5см³}.

Серологічні властивості. Вірус має гемаглютинуючу активність по відношенню до еритроцитів свині й кішки та не аглютинуює еритроцити морської свинки та півня. Володіє преципітуючою активністю у реакції імунодифузії (РІД) зі специфічними гіперімунними сироватками.

Основні умови зберігання. Ізолят зберігається у морозильних шафах при температурі -20 °С у лабораторії вірусології науково-виробничого центру ветеринарної медицини птахівництва Луганського національного аграрного університету.

Вірусний ізолят ЄН-5/2 відноситься до родини Parvoviridae, рід Parvovirus.

Підтримання штаму проводять шляхом репродукції на курячих ембріонах та чутливих культурах клітин.

Ізолят ЄН-5/2 парвовірусу собак має наступні біологічні властивості.

Приклад 1. Патологічні зміни в заражених курячих ембріонах (КЕ) 9 - добової інкубації патологічним матеріалом з метою ізоляції парвовірусу, супроводжувалися: потовщенням, гіперемією, крововиливами, та утворенням тяжів на хоріоантотомісній оболонці (ХАО), а також неправильним положенням зародків й крововиливами на його тілі. При розтині ембріонів реєстрували гіперемію легень та серця, глинистий колір печінки. Із збільшенням кількості пасажів у КЕ деякі патологічні зміни ставали менш інтенсивними. Титр ізоляту ЄН-5/2 після 1-го пасажу па курячих ембріонах становив $10^{4,25}$ ЕІД_{50/0,2см³}.

Приклад 2. У перещеплюваній культурі клітин Vero ізоляти ЄН-5/2 викликав цитопатичний ефект (ЦПЕ) через 24 години після інфікування. Клітини Vero впродовж 10 - 13 пасажів вирощували на середовищі 199 та Ігла (50:50) з додаванням плазмозамінюючого розчину геосену (10%) та антибіотиків: натрієва сіль бензилпеніциліну та сульфату стрептоміцину по 100 ОД/см³. Перші морфологічні

зміни культури проявлялися заокругленням клітин та збільшенням цитоплазматичних відростків. Клітини набували зернистості, а потім відшаровувалися від скла. Через 120 годин після інфікування частина клітин моношару містила внутрішньоядерні тільця -включення, у вигляді цільних гранул, серповидної або сферичної форми з чіткими та рівними межами, що заповнювали майже все ядро (Фіг.1). Внутрішньоядерні тільця - включення у культурі Vero (об.х10, ок. х100). Поступово починаючи з 6 доби після зараження, тільця - включення виділялися із клітини, а на їх місці утворювалися вакуолі. В ядрах відмічали збільшення кількості ядерців, які знаходились по периферії. Локальну деструкцію моношару та вакуолізацію спостерігали на 6 добу (Фіг.2.). Цитопатичні зміни культури Vero на 6 добу після інфікування ізолятом парвовірусу ЄН-5/2. Округлення та вакуолізація окремих клітин (об.х7, 10). Цитопатичний ефект, викликаний ізолятом ЄН-5/2 є характерним для розмноження парвовірусу собак у культурі клітин.

Приклад 3. Ізолят парвовірусу ЄН-5/2 стабільно культивується у первинній культурі клітин ФКЕ. Цитопатичну дію, що проявлялась деструкцією моношару, значним заокругленням та зернистістю клітин спостерігали вже через 24 години після інфікування. Повну дегенерацію моношару реєстрували через 72 години після зараження (Фіг.3.) Цитопатична дія ізоляту парвовірусу ЄН-5/2 у культурі клітин ФКЕ (об.х10, ок. х100). Титр у культурі клітин ФКЕ становив $10^{5,25}$ ТЦД_{50/0,5см³}.

Приклад 4. Гемаглютинаційну активність ізоляту ЄН-5/2 визначали по відношенню до 1 % зависі еритроцитів півня, морської свинки, свині та кішки. Дворазові розведення вірусу готували на фізіологічному розчині (рН=6,0) для визначення рівня гемаглютининів з еритроцитами свині та кішки. Реакцію проводили за температури + 4°С. Встановлено титр гемаглютининів до еритроцитів свині 1:64, кішки 1:8. Впродовж пасажів титр гемаглютининів із еритроцитами свині знижується до 1:16. Для гемаглютинації із еритроцитами півня та морської свинки використовували фіз. розчин рН 7,2, t +37,2°С. Ізолят ЄН-5/2 не аглютинував еритроцити морської свинки та півня, що також підтверджує його належність до парвовірусу собак.

Приклад 5. Ідентифікацію ембріонального та культурального матеріалу ізоляту ЄН-5/2 та встановлення аутентичності щодо парвовірусу собак проводили у ПЛР. Ізоляцію сумарної ДНК проводили за допомогою набору для екстракції ДНК виробництва фірми АмпліСенс, Москва, Російська Федерація. Реакцію ампліфікації з визначенням належності ДНК збудника до парвовірусу собак проводили за допомогою комерційних наборів праймерів виробництва фірми АмпліСенс «Парво-Вір» (довжина амплікону 385 п.н.), що фланкують ділянку NS1 або VP2 генів. Ампліфікаційний режим включав наступні цикли: ініціальну денатурацію, денатурацію, віджиг праймерів, і елонгацію, фінальну елонгацію. Електрофоретичний аналіз ампліконів проведений за допомогою набору для електрофорезу виробництва НВО Нарвак, Москва, Російська Федерація. Концентрація агарози в гелі 1,5 %, сила струму 120 В.

За результатами ПЛР встановлено, що досліджувані ДНК ізоляту ЄН-5/2 специфічно реагує з системою праймерів генів парвовірусу собак.

На Фіг.4 зображені результати ампліфікації проб ДНК польового ізоляту ЄН-5/2 (1,2), К⁺- позитивний контроль, К⁻- негативний контроль.

Приклад 6. Первинну детекцію вірусеміщуючого матеріалу ЄН-5/2 проводили з гіперімунною сироваткою від кролів щодо референтного штаму парвовірусу собак (вакцина „Біовак РА“) у РІД. Відсутність аденовірусної інфекції контролювали у РГА щодо еритроцитів морської свинки. Подальшу індикацію ізоляту парвовірусу ЄП-5/2 проводили за допомогою специфічних гіперімунних сироваток, отриманих до ізоляту парвовірусу собак ЄН-5/2 від кролів з преципітуючою активністю $2,04 \pm 0 \log_2$; $3,5 \pm 0,5 \log_2$; $4,5 \pm 0,5 \log_2$ у РІД методом Оухтерлоні. Використовували агар 1,5% пофарбований метилоранжем та консервованій меріолятом натрію. При дослідженні ембріонального (I пасаж) та культурального (II пасаж) матеріалу встановлена концентрація антигену на рівні $7 \log_2$ та $6 \log_2$ відповідно. На Фіг.5. представлені результати титрування ізоляту парвовірусу ЄН-5/2 за методом Оухтерлоні з використанням специфічної сироватки з активністю $4,5 \log_2$.

Приклад 7. Ідентифікацію ізоляту парвовірусу ЄН-5/2 та визначення віруснейтралізуючих антитіл у сироватці проводили у реакції нейтралізації (РН) із постійною дозою антигену та дворазовим послідовним розведенням специфічної сироватки у первинній культурі клітин ФКЕ.

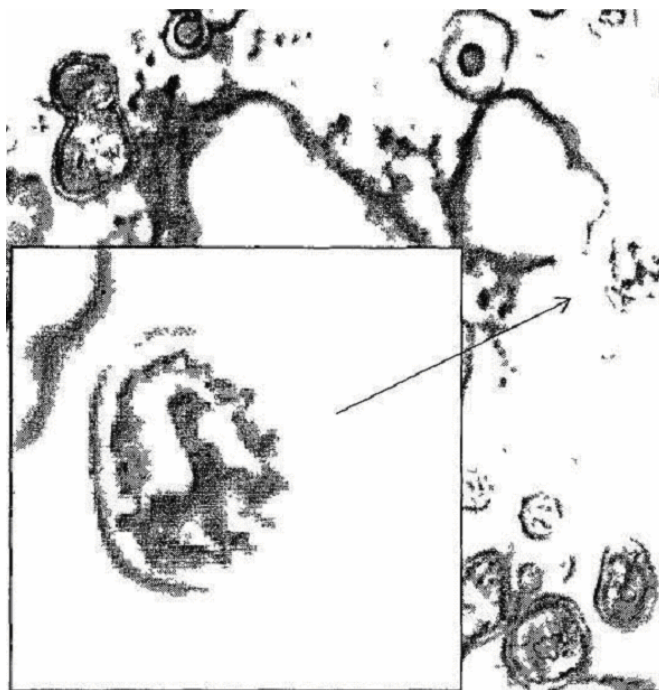
Результати РН парвовірусу ЄН-5/2 свідчать, що гіперімунна сироватка з титром преципітуючих

антитіл $2 \log_2$ у РІД до ізоляту ЄН-5/2 на 100% нейтралізувала інфекційну активність вірусу у первинній культурі клітин ФКЕ у розведенні 1:4. У розведенні 1:8 - тільки у 75% тест - об'єктів, а від 1:16 до 1:64 блокувала прояв цитопатичної дії у 25%. Титр віруснейтралізуючих антитіл специфічної сироватки становив 1:27,7.

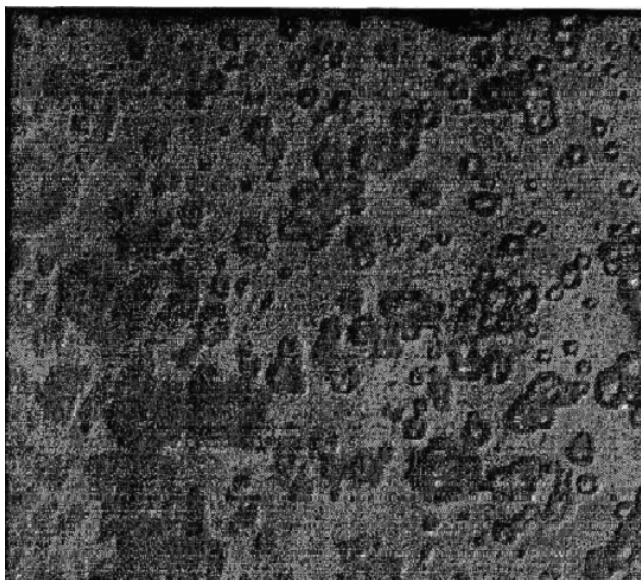
Приклад 8. Визначення морфологічних особливостей ембріонального матеріалу ЄН-5/2 I пасажу проводили за допомогою електронної мікроскопії методом негативного контрастування. В якості плівки-підложки застосовували 0,3% розчин формвару, розчиненого у хлороформі. Після нанесення контрастуючого розчину (4% водний розчин фосфорно-вольфрамової кислоти, рН 6,7-6,8) сітку досліджували в електронному мікроскопі ПЕМ-125К у прискореній напрузі 75 кВ.

За умов негативного контрастування встановили характерні для парвовірусу собак вірусні частки без зовнішньої мембрани, округлої форми, розміром 22-25 нм. У полі зору віріони розташовувалися групами попарно. Зустрічалися віріони овальної форми довжиною 30 нм, шириною 27 нм. На і Фіг.6. зображені віріони ізоляту парвовірусу собак ЄН-5/2. Негативний контраст (збільш., $\times 100000$).

Вірусний ізолят ЄН-5/2 парвовірусу собак успішно культивується в 9-добових курячих зародках, адаптується до культури клітин Vero та первинної культури ФКЕ, може бути використаний для накопичення біомаси, для виробництва діагностичних антигенів та вакцинних препаратів, отримання гіперімунних сироваток від тварин-донорів.



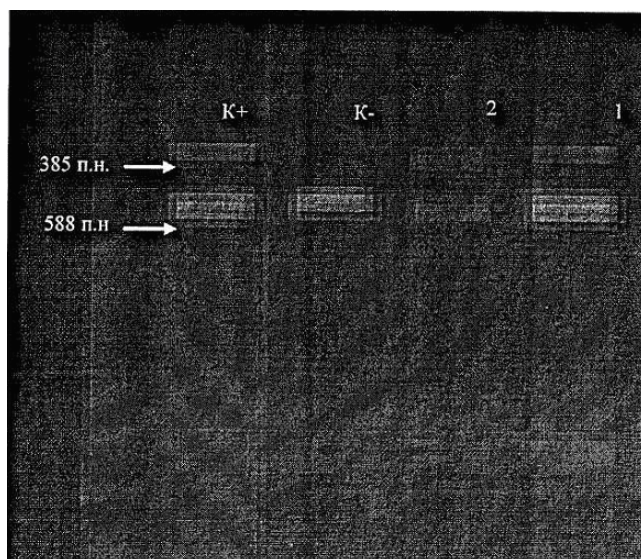
Фіг.1



Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4

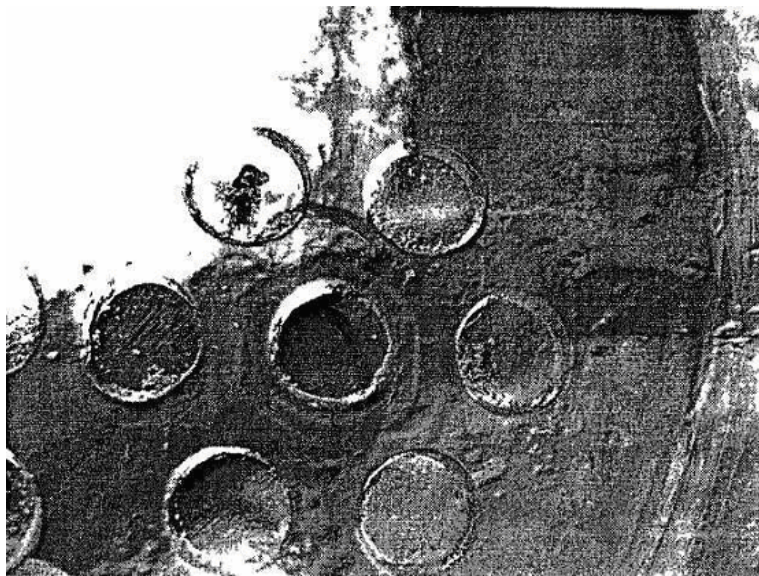


Fig. 5

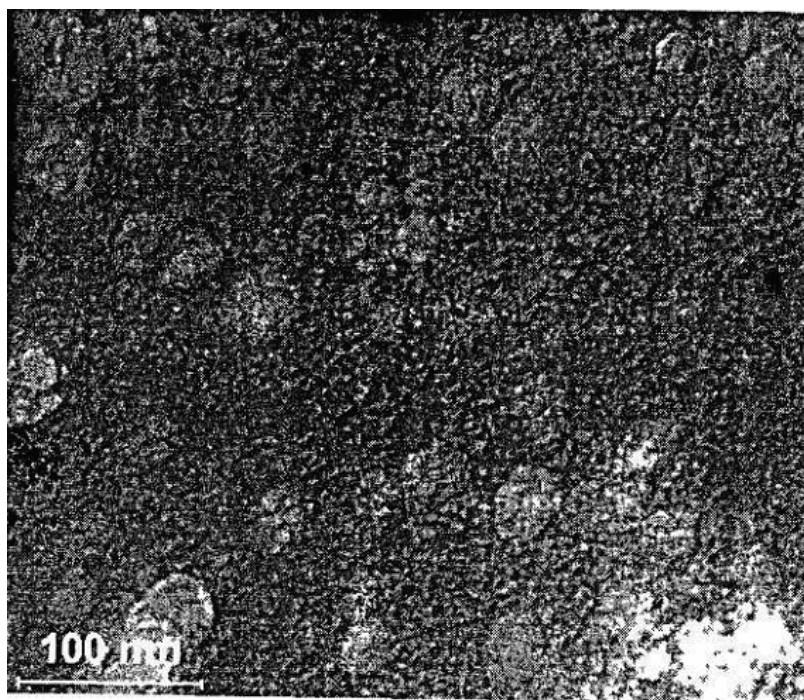


Fig. 6