



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80546** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 7/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 10776	(72) Винахідник(и): Музика Денис Васильович (UA), Стегній Антон Борисович (UA), Рула Олександр Миколайович (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.09.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2013, Бюл.№ 11	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) ШТАМ ВІРУСУ НИЗЬКОПАТОГЕННОГО ГРИПУ ПТИЦІ А/ЧИРЯНКА/ДЖАНКОЙ/4-17-11/10 H5N2

(57) Реферат:

Штам вірусу низькопатогенного грипу птиці А/чирянка/Джанкой/4-17-11/10 H5N2 виділений із клоакального змиву здорової дикої чирянки малої Anas crecca для виготовлення ветеринарних імунобіологічних препаратів.

UA 80546 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології та біотехнології і може використовуватися для виготовлення ветеринарних імунобіологічних препаратів (інактивованих вакцин, діагностичних тест-систем), а також для наукових досліджень.

Сучасні діагностика та специфічна профілактика захворювання птиці на грип базується на використанні для цього як виробничих сучасних актуальних штамів вірусів, які за антигенними, імуногенними властивостями найбільш відповідають епізоотичним штамам вірусів, що викликають захворювання на даний час.

Існує штам вірусу грипу А/качка крижень/Пенсильванія/10218/84 (H5N2), який є непатогенним для птахів та людини, використовується для моделювання гриппозної інфекції (патент Российской Федерации на изобретение № 2163637. Штамм вируса гриппа А/Н5N2/ ГKB № 2340 птиц для моделирования гриппозной инфекции / Смирнов Ю.А., Липатов А.С. Гительман А.К. Заявл. 15.10.1999; опубл. 27.02.2001).

Штам вірусу грипу А/крячок/Південна Африка/61 є еталонним та використовується для виготовлення діагностикума. Має інший тип нейрамінідази. (Діагностика вірусних болезней животных: Справочник/ В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. - М.: Агропромиздат, 1991. - 528 с.)

Заявлений штам А/чирянка/Джанкой/4-17-11/10 H5N2 схожий з вищепереліченими аналогами, але по суті являє собою новий, оригінальний в антигенному відношенні вірус. Штам належить до вірусів грипу А з гемаглютиніном підтипу H5. Має підтип нейрамінідази N2, є низькопатогенним для птиці. Він відрізняється від першого вірусу новими антигенними властивостями, а від другого вірусу - підтипом нейрамінідази.

В основу корисної моделі поставлено задачу одержати штам низькопатогенного вірусу грипу птиці А/чирянка/Джанкой/4-17-11/10 H5N2 шляхом виділення ізоляту вірусу грипу птиці з низькою патогенністю з природного резервуару збудників - диких водоплавних птахів.

Штам вірусу грипу А/чирянка/Джанкой/4-17-11/10 H5N2 був виділений у 2010 році з клоакального змиву клінічно здорової чирянки малої *Anas crecca*, яка була добута мисливцями під час сезону полювання. Біологічний матеріал від диких птахів було відібрано під час моніторингових досліджень диких водоплавних птахів в АР Крим в Джанкойському р-ні. Штам вірусу грипу птиці зареєстрований та зберігається у колекції мікроорганізмів відділу вивчення хвороб птиці Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини", м. Харків, вул. Пушкінська, 83, Україна, під № 12/5/27, родина *Orthomyxoviridae*, під *Influenza virus A*.

Штам характеризується наступними біологічними властивостями:

Культурально-морфологічні ознаки (умови культивування *in vitro* та *in vivo*, цитопатичний ефект, вкраплення, титри вірусу тощо): віріони мають округлу, ниткоподібну, грушоподібну форми діаметром 80-120 нм, ікосаедрального типу симетрії, нуклеокапсид спіральної симетрії, оточений складною тришаровою оболонкою, яка складається з білкової мембрани та подвійного шару ліпідів. Глікопротеїдні субодиниці (гемаглютинін та нейрамінідаза) гідрофобними кінцями занурені в ліпідний шар. Приблизний хімічний склад віріонів грипу представлений 0,8-1,1 % - РІЖ, 70-75 % - білки, 20-24 % - ліпіди, 5-8 % - вуглеводи. Вірус культивується в курячих ембріонах 9-11-добового віку при інфікуванні в алантоїсну порожнину з накопиченням гемаглютинінів в титрі 1:64. Інфекційний титр становить 6,5 Ід_{50/0,2} мл, летальний - 1,78 Ід_{50/0,2} мл. Вірус може викликати загибель до 25 % курячих ембріонів (КЕ) через 48-120 годин.

Умови зберігання. Штам вірусу зберігають у ліофілізованому вигляді за температури мінус 20 °С, а також у рідкому стані за температури від мінус 70 °С до мінус 80 °С.

Підтримання штаму. Штам вірусу підтримують шляхом освіження на 9-11 добових курячих ембріонах кожні 5 роки при зберіганні у ліфілізованому стані, або кожні 2-3 роки при зберіганні у рідкому стані за температури мінус 70 °С. Патогенність штаму.

Патогенність вірусу визначали за інтравенозним індексом патогенності (ІВІП) за загальноприйнятими методиками МЕБ. Результати представлені в таблиці.

Наступним етапом були визначені патогенності цього вірусу. Результати наведені в таблиці.

Таким чином встановлено, що цей вірус є низькопатогенним. Він не викликає захворювання у птиці протягом 10 днів після інтравенозного інфікування.

Приклад. Здатність вірусу викликати захворювання у чутливої птиці та передаватися при прямому контакті.

Інтраназально інфікували курчат 42 добового віку вірусом низькопатогенного грипу птиці А/чирянка/Джанкой/4-17-11/10 H5N2 в дозі 10^{6,0} ЕІД₅₀ протягом 10 діб. При цьому не було виявлено ніяких клінічних ознак та відхилень від фізіологічної норми. При проведенні вірусологічних досліджень клоакальних та назооральних змивів були отримані негативні результати, які свідчили про те, що виділення вірусу в навколишнє середовище не відбувалось.

Крім того при підсажуванні здорових неінфікованих курчат до інфікованих інтраназально перезараження не відбувалося, що підтверджено результатами вірусологічних та серологічних досліджень.

При патологоанатомічному розтині вимушено забитих інфікованих інтраназально курчат не виявлено будь-яких макроскопічних змін у зовнішньому вигляді, шкіра, м'язові тканини мали звичайний вигляд, набряків не виявлено. В той же час при розтині інфікованих курчат через 4 доби після інфікування виявлено збільшення селезінки, катальний ентерит в тонкому та товстому кишечнику, а також невеликі крововиливи на слизовій оболонці дванадцятипалої кишки та в боугенієвих залозах в місці біфуркації.

Інтраназальне та інтравенозне інфікування курчат призводить до напрацювання специфічних антитіл до гемаглютиніну та нуклеопротейну.

При проведенні секвенування ділянки гена гемаглютиніну H5 та нейрамінідази N2 встановлено спорідненість цього вірусу з низькопатогенними вірусами грипу птиці, що циркулюють в популяції диких водоплавних птахів в Європі.

Таким чином за результатами серії дослідів нами встановлено, що вірус грипу птиці А/чирянка/Дж/4-17-11/10 H5N2 є низькопатогенним вірусом грипу, який не викликає захворювання у чутливої птиці ні при інтравенозному, ні при інтраназальному інфікуванні. Крім того нами встановлено, що репродукція вірусу в організмі птиці є дуже низькою, що підтверджується тим фактом, що протягом періоду спостереження виділення збудника в навколишнє середовище не встановлено. Це також було підтверджено негативними результатами досліджень контактних не інфікованих курчат, які були підсажені до курчат інфікованих інтраназально. В той же час вірус при інфікуванні птиці викликав імунну відповідь у курчат. Вище перелічені факти свідчать про стабільність біологічних властивостей цього штаму, а також його нові антигенні властивості, що дає змогу використання цього вірусу як виробничого для виготовлення імунобіологічних препаратів, а також як модельного вірусу для наукових експериментів.

Таблиця

Визначення ІВІП вірусу А/чирянка/ Дж/4-17-11/10H5N2

Клінічний стан	Дні спостереження										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Сума
	Кількість курчат з специфічними ознаками										
Нормальний клінічний стан	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100 × 0=0
Хворі	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Сильно хворі	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Загиблі	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Всього											0
ІВІП											0,0

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Штам вірусу низькопатогенного грипу птиці А/чирянка/Джанкой/4-17-11/10 H5N2, що виділений із клоакального змиву здорової дикої чирянки малої *Anas crecca* для виготовлення ветеринарних імунобіологічних препаратів.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601