



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **95831**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 7/08** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 07636**

(22) Дата подання заявки: **07.07.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **12.01.2015**

(46) Публікація відомостей **12.01.2015, Бюл.№ 1**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Кубасєв Артур Петрович (UA),  
Краснобаєв Євгеній Олександрович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
НААН УКРАЇНИ,  
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)**

**(54) ВАКЦІЙНИЙ ШТАМ "H120" (клон 311) РІД CORONAVIRUS ВИД AVIAN CORONAVIRUS СЕРОТИПУ MASSACHUSETTS ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ**

(57) Реферат:

Вакцинний штам "H120" (клон 311) рід Coronavirus вид Infectious bronchitis virus серотипу Massachusetts для виробництва живої вакцини клонований у вільних від специфічних патогенів курячих ембріонах та зареєстрований у колекції штамів мікроорганізмів лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини НААН. Призначений для напрацювання вірусовмісної сировини з використанням ВСП-біотехнології з метою виробництва живої вакцини для профілактики та контролю інфекційного бронхіту курей.

**UA 95831 U**



Корисна модель належить до ветеринарної вірусології та біотехнології, може використовуватися як жива вакцина для профілактики і контролю інфекційного бронхіту курей (ІБК).

Основою профілактики та контролю ІБК є вакцинація з використанням живих та інактивованих вакцин. Живі вакцини звичайно використовують для щеплення бройлерів та курчат на стадії вирощування, інактивовані вакцини - для щеплення комерційних стад несучок та стад репродукторів. Проте інактивовані вакцини застосовують лише після праймування птахів живими вакцинами, тому вважається, що останні лежать в основі профілактики та контролю захворювання [1].

В основі ефективної програми вакцинації лежить відповідність наявних в розпорядженні вакцин польовим штамам вірусу інфекційного бронхіту (ВІБ), поширеним в регіонах (країнах), оскільки перехресний захист слабкий або відсутній. Тому особливого значення набуває інформація щодо поширення таких типів. Відомо, що для України та світу в цілому одним із найпоширеніших та актуальних є серотип Massathusets [2, 3, 4, 5]. Проте, з 40 зареєстрованих в Україні живих вірус-вакцин жодного зразка вакцини цього серотипу вітчизняного виробництва немає. Саме тому й виникла нагальна потреба у розробці вакцини проти ІБК серотипу Massathusets, у відповідності сучасним вимогам та стандартам.

Найближчими аналогами є деклараційні патенти на корисні моделі України: № 26102 "Ізолят ЛІ-1 як продуцент антигену вірусу інфекційного бронхіту курей" [6] та № 26692 "Ізолят ЛІ-2 як продуцент антигену вірусу інфекційного бронхіту курей" [7]. З одного боку дані штами є епізоотичними місцевими і можуть бути використаними як антиген лише для виготовлення інактивованої вакцини, оскільки вони не атенуйовані та патогенні для курчат. Такі вакцини можуть бути застосовані, в основному, лише проти місцевих ізолятів коронавірусної інфекції птахів [8]. Виходячи з даних патентів, адаптацію ізолятів проводили на звичайних курячих ембріонах (КЕ), що несе в собі ризик прихованої контамінації сторонніми збудниками. З іншого боку, в патентах на корисну модель не вказано, до якого типу належать виділені ізоляти. Дана інформація є вкрай важливою, адже для ВІБ характерним є те, що перехресний захист проти гетерологічних типів слабкий або відсутній взагалі, тому необхідно застосовувати вакцини зі штамів гомологічних польовим ізолятам, які викликають захворювання.

В основу корисної моделі поставлена задача отримати клоновану, генетично однорідну популяцію вакцинного штаму ВІБ "Н120" серотипу Massathusets з використанням вільних від специфічних патогенів (ВСП) КЕ (ВСП-КЕ) з метою напрацювання вірусомісної сировини високої біологічної активності для створення вітчизняної сучасної живої вакцини проти ІБК з використанням ВСП-біотехнології, в першу чергу, проти одного з найактуальніших для України серотипу ВІБ Massathusets.

Вакцинний штам ВІБ Н120 серотипу Massathusets належить до родини Coronaviridae роду Coronavirus вид Avian Coronavirus, зберігається в лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини НАДІ І в скрапленому азоті та був наданий для робіт по адаптації і клонуванню та дослідження культуральних та імунобіологічних властивостей. Інфекційна активність вихідного вірусу склала  $6,5 \pm 0,17 \text{ Ig EID}_{50}/\text{cm}^3$  при титруванні на ВСП-КЕ 10-добового віку.

Адаптацію ВІБ Н120 та клонування проводили в використанням ВСП-КЕ 10-добової інкубації. КЕ заражали в алантоїсну порожнину. Заражені ембріони інкубували при температурі  $37,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$  та відносній вологості 50-60 % 48 годин після зараження (ГПЗ). Загибель заражених КЕ в перші 24 інкубування вважали неспецифічною.

Інфекційну активність ВІБ визначали методом титрування на ВСП-КЕ серійними 10-разовими розведеннями. Заражені ембріони інкубували за температури  $37 \pm 0,1^\circ \text{C}$  протягом 7 діб після зараження (ДПЗ). Загибель КЕ в період після 24 годин після зараження вважали специфічною дією вірусу. Після закінчення терміну інкубації оцінку репродукції ВІБ проводили за наявністю недорозвинених ембріонів (карликів). Титр інфекційної активності розраховували за методом Кербера в модифікації Ашмаріна і виражали в  $\text{EID}_{50}/\text{cm}^3$  [9].

Всього проведено 3 послідовних адаптаційних пасажі вихідного ВІБ Н120 до ВСП-КЕ та 3-разове клонування методом граничних розведень віру-адаптаційного пасажу в цій системі культивування. Селекцію клонів проводили за ознакою високого накопичення інфекційного вірусу. Отримано клони вірусу які мають значення титру на рівні  $7,1-7,23 \text{ Ig EID}_{50}/\text{cm}^3$ . Для подальших досліджень вибрали Клон 311 (КЗ 11).

Нешкідливість ВІБ Н120 Клон 311 визначали на курчатах однодобового віку, отриманих з ВСП-КЕ. Вірусний матеріал вводили в дозі  $10^\circ \text{EID}_{50}$  (10 доз щеплення) велико-крапельним спреєм. Спостереження за клінічним станом курчат проводили протягом 3 тижнів після

інфікування. На 7 і на 14 день після введення вірусу проводили забій частини курчат для патологоанатомічних і гістологічних досліджень.

Після щеплення курчат клінічних ознак захворювання або загибелі не спостерігали протягом строку спостереження (3 тижні). При патологоанатомічному розтині курчат через 7 та 14 днів після інфікування ознак патологічних змін не виявили. При проведенні гістологічних досліджень трахей заражених курчат патологічних змін також не виявлено.

Дослідження антигенних властивостей ВІБ Н120 К3 11 здійснено на курчатах однодобового віку, отриманих з ВСП-КЕ. Курчат інфікували 2 або 3 рази з 3-тижневим інтервалом дозою вірусу  $10^{3.5}$  ЕІД<sub>50</sub>. Відбір крові та дослідження сироваток проводили через 2-3 тижні після кожної вакцинації. Наявність та титр ВІБ-специфічних антитіл визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням комерційних діагностичних тест-систем фірми IDEXX (США).

Після 3-разового щеплення курчат починаючи з однодобового віку антитіла до ВІБ виявлено у 80 % птиці. Рівень антитіл при цьому коливався в межах 409-10871. Після 2-разового щеплення курчат починаючи з 3-тижневого віку, ВІБ-специфічні антитіла виявлено у 90 % птахів, а титри знаходяться в межах 876-11876.

Імуногенність ВІБ Н120 К311 досліджували на курчатах 3-тижневого віку отриманих з ВСП-КЕ. Курчат щеплювали ВІБ Н120 К311 великокрапельним спреєм в дозі  $10^{3.5}$  ЕІД<sub>50</sub> (1 доза щеплення), після чого, через 3 тижні, піддавали зараженню вірулентним референтним штамом ВІБ М41 серотипу Massachusetts тим же способом введення дозою  $10^{3.5}$  ЕІД<sub>50</sub>. Спостереження за клінічним станом вели протягом 4-6 днів після зараження, після чого піддали евтаназії для дослідження роботи ворсинчастого (циліарного) епітелію трахеї (тест на циліостаз).

Циліостаз (ЦС) - втрата циліарної активності (ЦА) війчастого епітелію трахеї. Визначення наявності і ступеню циліостазу проводили шляхом дослідження циліарної активності ворсинчастого епітелію трахеї курчат. Для цього препарували трахею й визначали наявність і ступінь циліостазу ворсинчастого епітелію шляхом дослідження під малим збільшенням мікроскопа (окуляр  $\times 8$ , об'єктив  $\times 10$ ) 10 кілець трахеї від кожного курчати, отриманих з верхньої, середньої і нижньої її частини [10]. Оцінку ЦС проводили в балах, від 0 до 4. Критерій оцінки: 0 балів - 100 % циліарної активності (ЦА); 1 бал - 75 % ЦА; 2 бали - 50 % ЦА; 3 бали - 25 % ЦА; 4 бали - 0 % (відсутність) ЦА. Циліарна активність на рівні 50-100 % (загальна кількість балів циліостазу менше 20) вказує на захисну дію використаного для щеплення вірусу.

Клінічних ознак захворювання серед щепленою курчат не відмічали. Дослідження циліарної активності епітелію трахеї курчат на 4<sup>тв</sup> і 6<sup>тв</sup> ДПЗ виявило у частини птахів (6 із 10) ЦС на рівні 1-9 балів і лише у одного курчати - на рівні 22 бали. Тобто ВІБ Н120 К311 викликав захист 90 % птахів проти зараження вірулентним референтним штамом ВІБ М41.

Культуральні властивості. ВІБ Н120 Клон 311 розмножували у ВСП-КЕ. Накопичення вірусу відбувалось на рівні  $8,07 \pm 0,06$  Іг ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> при дозі зараження 10 ЕІД<sub>50</sub>;  $(7,57 \pm 0,15) - (7,87 \pm 0,15)$  Іг ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> - при  $10^2$  ЕІД<sub>50</sub>;  $(7,67 \pm 0,15) - (7,77 \pm 0,06)$  Іг ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> - при  $10^3$  ЕІД<sub>50</sub> та  $(7 \pm 0,2) - (7,4 \pm 0,17)$  Іг ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> - при  $10^4$  ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> та температурі культивування 37 °С. В залежності від температури культивування вірус накопичувався відповідно при 36 °С на рівні  $(7,57 \pm 0,15)$  -  $(7,93 \pm 0,25)$  Іг ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>; при температурі культивування 37 °С - на рівні  $(7,77 \pm 0,15)$  -  $(8,07 \pm 0,15)$  Іг ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> та при температурі культивування 38 °С - на рівні  $(7,9 \pm 0,2)$  -  $(8,27 \pm 0,15)$  Іг ЕІД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Оптимальним часом репродукції ВІБ Н120 К311 є діапазон часу від 24 до 48 годин в залежності від температури культивування.

Джерела інформації:

1. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus // Vet Research. - 2007. - Vol. 38. - P. 281-297.
2. Jackwood Mark W. Review of infectious bronchitis virus around the world // Avian Diseases. - 2012. - Vol. 56 (4). - P. 634-41.
3. Лук О. Правильна, коректна схема вакцинації проти збудника ІБК важливе комплексне рішення у забезпеченні благополуччя стад / О. Лук // Наше птицеводство - 2011. - № 2. - С. 17-21.
4. Инфекционный бронхит кур - современная ситуация, лабораторная диагностика, специфическая профилактика / Е. А. Краснобаев [та ін.] // Сучасна ветеринарна медицина. - 2011. - № 1. - С. 23-28.
5. Килименко В.В. Инфекционный бронхит кур: анализ текущей ситуации в Украине. Защита от вариантных штаммов возбудителя / В.В.Килименко, Е.А.Краснобаев // Сучасна ветеринарна медицина. - 2012. - № 5. - С. 14-16.
6. Декл. пат. U200613813; Україна, МПК С12N 7/00. Ізолят ЛІ 1 як продуцент антигену вірусу інфекційного бронхіту курей (родина Coronaviridae, Coronavirus) / Л. І. Пархоменко, М. М. Ігнатів, Л. Ю. ' Нестерова; заявник і патентовласник Луганський нац. аграр. ун-т... - № 26102; заявл. 25.12.2006; опубл. 10.09.2007, Бюл. 14. - 8 с.

7. Декл. пат. и200613927; Україна, МПК C12N 7/00. Ізолят ЛІ 2 як продуцент антигену вірусу інфекційного бронхіту курей (родина Coronaviridae, Coronavirus) / Л. І. Пархоменко, Л. Ю. Нестерова, М. Аль Равашдех; заявник і патентовласник Луганський нац. аграр. ун... - № 26692; заявл. 27.12.2006, опубл. 10.10.2007, Бюл. 16. - 8 с.
- 5 8. Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин (и др.) // Вирус инфекционного бронхита. - М.: ВНИТИБП, 1998. - С. 183-198.
9. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П.Ашмарин, А.П.Воробьев. - Л.: Медгиз, 1962. - 180 с.
- 10 10. The ciliostasis test-measuring protection against Infectious Bronchitis. Intervet [Electronic resource]. - Mode of access: <http://www.infectious-bronchitis.com/ciliostasis-test.asp>. - Title from the screen.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Вакцинний штам "H120" (клон 311) рід Coronavirus вид Infectious bronchitis virus серотипу Massachusetts для виробництва живої вакцини, що клонований у вільних від специфічних патогенів курячих ембріонах та зареєстрований у колекції штамів мікроорганізмів лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини НААН, призначений для напрацювання вірусомісної сировини з використанням ВСП-біотехнології з метою виробництва живої вакцини
- 20 для профілактики та контролю інфекційного бронхіту курей.

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

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