



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

(21) 1901351

(22) 13.09.2019

(46) Бюл. 168, 2021

(71)(73) Институт проблем биологической безопасности АСХН (ТJ)

(72) Шоназар Дж.М. (ТJ); Махмудов К.Б. (ТJ); Амирбеков М. (ТJ); Мираков А.З. (ТJ); Рахимов А.А. (ТJ); Абдукосими А. (ТJ); Назаров Ф.С. (ТJ)

(54) **ШТАММ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА «AAVA1CHICKEN TADJIKISTAN GISSOR 6» ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ АНТИГЕН В РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГЛЮТИНАЦИИ**

(56) 1. Штамм вируса болезни Ньюкасла для использования при серодиагностике болезни Ньюкасла в РТГА (патент Ru 2482 184, 2013.05.20).

2. Alexandr D.J. Newcastle disease and other avian Paramyxovirus // Rev.sci. tech. off. Int. Epiz. – 2000. - Vol. 19(2). – P.443-462.

3. Kaverin N. V., L'vovD.K. Paramiksovirusy (Paramyxoviridae) V kn.: *Medicinskajavirusologija* - 2008.P. 183–189.

4. Czeglédi A., Ujvári D., Somogyi E. et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications // *Virus Res.* - 2006. - Vol. 120(1-2). - P. 36-48.

5. Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A.G. et al. Characterization of Pigeon Paramyxoviruses (Newcastle disease virus) Isolated in Kazakhstan in 2005 // *Virologica Sinica.* - 2012. - Vol. 27(2). - P. 93-99.

6. Khan T.A., Rue C.A., Rehmani S.F. et al. Phylogenetic and biological characterization of Newcastle disease virus isolates from Pakistan // *J.Clin.Microbiol* – 2010. Vol. 48(5). – P.1892-1894.

7. Cattoli G., Fusaro A., Monne I. et al. Emergence of new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa implications for diagnosis and control// *Vet.Microbiol* – 2010. Vol. 142(3-4). – P.168 -176.

8. Diel D.G., Miller P.J., Wolf P.C. et al. Characterization of Newcastle disease virus isolated from cormorant and gull species in the United States in 2010 // *Avian Dis.* -2011. - Vol. 56. - P. 128-133.

9 Alexandr D.J. Newcastle disease in the European Union 2000 -2009// *Avian Pathol.* *J.Clin.Microbiol* – 2011. Vol. 40(6). – P.547-558.

10. Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A.G. et al. Characterization of Pigeon Paramyxoviruses

(Newcastle disease virus) Isolated in Kazakhstan in 2005 // *Virologica Sinica.* - 2012. - Vol. 27(2). - P. 93-99.

11. Huang Y., Wan H.Q., Liu H.Q. et al. Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from outbreak in geese a novel six nucleotide insertion in the non - coding region of the nucleoprotein gene// Brief report , *Arch. Virol* – 2004. Vol. 149(7). – P.1445-1457.

12. Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A.G. et al. Molecular characterization of virulent Newcastle disease virus Isolated from chicken during the 1998 NDV outbreak in Kazakhstan // *Virus Genes.* – 2000.- 31 – N1- P. 13-20.

13. Коротецкий И.С., Богоявленский А.П., Прилипов А.Г. и др. Молекулярно – генетическая характеристика выделенных изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории Российской Федерации, Украины, Казахстана и Киргизии // *Вопросы вирусологии* - 2010. - №4 - С. 25-29.

14. Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A.G. et al. Newcastle disease outbreak in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001,2002,2003,2004 and 2005 were caused by virus of genotype VII and VII d // *Virus Genes.* – 2009.- Vol. 39. -N1- P. 94-101.

15. Шоназар Дж. М., Мамадатохонова Г. Н., Сиёмак Зоҳарӣ Филогенетический анализ изолятов вируса болезни Ньюкасла // *Журнал "БИО"ООО"Уралбиовет-Консалтинг".* 2018. Стр. 14-15.

16. Салимов Т.М., Махмадшоев А.Н., Хохлачёв О.Ф. Диагностика «полевой» НБ – инфекции // *Ветеринария.* №10-12(45), 2014. С. 24-25.

17. Brown, C.C., King, D.J. & Seal, B.S. Comparison of pathology-based techniques for detection of viscerotropic velogenic Newcastle disease virus in chickens // *Journal of Comparative Pathology.* – 1999. - Vol.120, - P. -383-389.

18. Alexander, D.J., Purchase H.G., Arp L.H., Domermuth C.H.& Pearson J.E. /A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Newcastle disease // *American Association of Avian Pathologists/ Avian Pathogens* -1989. Vol. 3. , - P. -114-120.

19. Wehmann, J. Herczeg, A. Ballagi et al., Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains B-1 by restriction site analysis of their matrix gene// *Vaccine* - 1997, Vol. 15. - P.1430-1433.

20. Goldhaft Tevis M. Guest Editorial Historical Note on the Origin of the LaSota Strain of Newcastle

Disease Virus // Avian Diseases – 1979. Vol. – 24. № 2, P. -297-301.

21. Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges // Infect Genet Evol - 2010 Vol. – 10(1):24. P. -26-35.

(57) Изобретение относится к ветеринарной вирусологии и может быть использовано для производства антигена в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) для диагностики Ньюкаслской болезни птиц.

Болезнь Ньюкасла является одним из серьезнейших заболеваний птиц, способным вызывать крупные падежи, причиняя огромный вред сельскому хозяйству и нанося серьезный экономический ущерб.

Для защиты от этого инфекционного возбудителя вполне достаточно вакцинации птиц на птицефабриках и крупных птицефермах. В небольших частных хозяйствах птицы зачастую не

вакцинируются вовсе, что повышает опасность возникновения эпизоотий при передаче вирулентного штамма от диких птиц домашним. Важную роль в борьбе с болезнью Ньюкасла играет своевременная диагностика, позволяющая выявлять очаги инфекции и предотвращать распространение возбудителя.

Техническим результатом настоящего изобретения является создание отечественного штамма вируса болезни Ньюкасла (ВБН), антигенно адекватного современным высокопатогенным штаммам ВБН, на основе которого создана антигенсодержащая сыворотка для более точной диагностики ВБН в РТГА.

Следует отметить, что предлагаемый штамм AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 может быть использован совместно с другими известными для более детального исследования антигенных характеристик вновь выделяемых штаммов ВБН и серодиагностики болезни птиц.

Изобретение относится к штаммам вируса болезни Ньюкасла (БН) для производства антигена в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) для диагностики Ньюкаслской болезни птиц.

Болезнь Ньюкасла - острая высоко контагиозная болезнь птицы отряда куриных, характеризующаяся вирусемией, явлениями геморрагического диатеза, поражением пищеварительного тракта, дыхательных органов и центральной нервной системы. ВБН имеет весьма обширный круг хозяев: он поражает огромное количество различных видов птиц. Вирус передается перназальным или пероральным путем.

Заболевание, вызываемое ВБН, протекает с разной интенсивностью и обладает разной способностью к передаче. Основываясь на тяжести протекания болезни, выделяют три прототипа ВБН: лептогенная ветвь вызывает весьма умеренное плохо детектируемое респираторное заболевание, мезогенная ветвь проявляется в нервных и респираторных расстройствах, вызывая умеренную смертность, велогенная ветвь вызывает тяжелые кишечные или неврологические повреждения, приводя к высокой смертности (до 100% цыплят) [1]. В зависимости от того какая из систем органов повреждается, велогенная ветвь делится на висцеротропную и нейриотропную. Несмотря на повсеместную вакцинацию, болезнь трудно поддается контролю, в связи с чем ее возбудитель внесен в список наиболее важных патогенов [2].

Согласно современной квалификаций все известные генотипы возбудителя болезни Ньюкасла разделяются на 2 класса с последующим разделением на 3 субгруппы и 15 генотипов.

Класс I разделяется на 9 генотипов а класс II включает в себе одиннадцать генотипов. Вирус болезни Ньюкасла класс I в основном изолированы от диких водоплавающих и береговых птиц.

Вирусы класса II в большинство случаев выделены от диких и домашних птиц. Вирусы этой группы отличаются значительной дивергентностью, филогенетический анализ выявил наличие в ее составе десяти ранее описанных генотипов и 5 новых (X, XII, XIII, XIV и XV). ПМВ-1 генотипов I, II, III, IV и IX считаются «ранними», так как они идентифицированы в период с 1930 до 1960 гг. Генотип II составляют, в основном, вирусы низкой патогенности, которые более 40 лет использовались для приготовления вакцин [3,4].

Генотип IX включал первый вирулентный штамм ВБН, выделенный в 1948 г. в Китае, вирусы этого генотипа до сих пор циркулируют в Азии, вызывая спорадические вспышки среди кур и домашних гусей.

Генотипы V, VI, VII, VIII и XI появились после 1960 гг. и считаются «поздними», при этом в группы: V, VI, VII и VIII входят только вирулентные вирусы, которые в настоящее время являются доминантными ПМВ-1 во всем мире. [6].

В генотип XIII, классифицировавшийся ранее как генотип VII[5], входят вирулентные ПМВ -1, изолированные в России, Иране и Пакистане между 1995 и 2008 гг.

По ранней классификации генотип XIV принадлежавший к линии 7 [6], также содержит вирулентные вирусы, выделенные в Центральной и Западной Африке в период 2006 -2008 гг. Варианты ВБН генотипа V возникли в 1970 гг. и наиболее часто выделяются в Центральной и Южной Америке от домашних птиц, а также в Северной Америке от бакланов; в последней классификации они ввиду своего выраженного разнообразия разделяются, по крайней мере, на два субгенотипа - Va и Vb [7].

Шестой генотип представлен многочисленными изолятами от птиц многих видов, которые особенно актуальны в связи с частой ассоциацией с голубями и постоянным риском внедрения в популяции домашних птиц [8].

Генотип VII до сегодняшнего дня наиболее часто вызывает вспышки БН в Азии и на Ближнем Востоке. Возбудитель этой разновидности вызывает серьезные опасения, так как некоторые штаммы обладают повышенной вирулентностью в отношении домашних птиц, в то время как другие характеризуются широким кругом хозяев и способностью инфицировать гусей [9,10]. На территории РФ так же были выделены генотипы 4, 5, 6 и 7 класса 2, а также ВБН класса 1. Имеются единичные сообщения об эволюционных взаимоотношениях различных штаммов БН, выделенных в Средней Азии [11,12]. В период с 1998 по 2005 гг. выделено 28 изолятов ВБН на территории Казахстана и Киргизии. Сравнительные филогенетические анализы генов Среднеазиатских штаммов ПМВ -1, показала, что изоляты охарактеризованных ПМВ -1 циркулирующих в период 1998-2001 гг. принадлежат к генотипу VIIb и VIId [13]. Этот генотип выявлено также на территорию Республики Таджикистана и может быть занесен дикими перелетными птицами.

В различных регионах Республики Таджикистан за период с 2014 по 2017 гг. с целью определения характеристики изолятов вируса болезни Ньюкасла вызвавших заболевание домашних птиц частных лиц было проведено исследования. Результаты исследования сравнительный филогенетический анализ генов показали, что выделенные изоляты циркулирующие в Таджикистане относятся к генотипу VIIi [14,15].

Важную роль в борьбе с болезни Ньюкасла играет своевременная диагностика, позволяющая выявлять очаги инфекции и предотвращать распространение из них возбудителя. Предварительный диагноз на Болезнь Ньюкасла (далее БН) ставят на основе эпизоотологических, клинических и патоморфологических данных. Однако значительная вариабельность симптоматики и патоморфологических поражений у инфицированной вирусом БН птицы диктует необходимость подтверждения первичного диагноза изоляцией и идентификацией возбудителя, а также установления у заболевшей птицы сероконверсии к последнему.

Точная диагностика вируса требует комбинирования различных методов, таких как анализ клинических симптомов (в том числе и гистологический анализ), выделение и наработка

вирусного материала и серологический анализ. Выявления ВБН может быть осуществлена с помощью *in situ* гибридизации [16]. Также весьма широко распространенным методом обнаружения ВБН является реакция торможения геммагглютинации [17].

Известны штаммы (штамм NDV/Pigeon/Omsk/13/2008) вируса болезни Ньюкасла, которые используются для создания диагностических сывороток (патент РФ № 2482 184, опублик. 20.05.2013).

Известен другой штамм вируса болезни Ньюкасла В1[18], используемый также для создания диагностических сывороток.

Наиболее близким аналогом (прототипом) является штамм вируса болезни Ньюкасла Ла Сота [19].

Выше приведенные штаммы относятся к классу 2, генотипу 2. Однако по причине антигенной дивергенции с наиболее опасными современными генетическими линиями (класс 2, генотип 7) точная диагностика и достоверная интерпретация результатов при использовании диагностических препаратов на основе сывороток, приготовленных с использованием штаммов В1 и Ла Сота, затруднена.

Техническим результатом настоящего изобретения является создание отечественного штамма вируса болезни Ньюкасла, антигенно адекватного современным высокопатогенным штаммам ВБН, на основе которого создана антигенсодержащая сыворотка для более точной диагностики ВБН в РТГА.

Указанный технический результат достигается получением штамма ВБН AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 для приготовления антигенсодержащей сыворотки с целью серодиагностики болезни Ньюкасла в РТГА.

Характеристика заявляемого штамма. Штамм ВБН AAvA1 Chicken Tadjikistan Gissor 6 является типичным представителем вируса болезни Ньюкасла род *Avulavirus*, семейство *Paromyxoviridae*. Заявляемый штамм выделен от трахеальный смыв циплэнка при вспышке на территории Джамоат Мирзо Ризо, г. Гиссар Республике Таджикистан в ноябрь месяце 2017 г. от частного сектора Штамм депонирован в Центр национальной коллекции патогенных микроорганизмов Института проблем биологической безопасности Таджикской академии сельскохозяйственных наук.

Источник получения. Из трахеального смыва, полученного от циплэнка, был выделен изолят вируса болезни Ньюкасла, который получил

название AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6. Вирус был выделен на РКЭ (Развивающий куриный эмбрион) на первом пассаже. Индикация вируса была проведена в Реакция Геммагглютинация (РГА) с эритроцитами петуха, но не агглютинировал эритроциты лошади: показатели геммагглютинирующей активности составляли 1:64-1:128 ГАЕ/0,2 мл. Инфекционная активность выделенного вируса составляла 5,2 лг ЭИД₅₀/мл.

Идентификация вируса. Первичная идентификация изолированного вируса болезни Ньюкасла

осуществлялась методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в закрытой пробирке в режиме реального времени с использованием праймеров и зонда, специфичных к консервативным участкам F-гена вируса болезни Ньюкасла, согласно [20].

Генетический и филогенетический анализ: РНК вируса БН выделяли с помощью коммерческого набора RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Германия согласно инструкции. Реакционный объем составил 20 µl (микролитр), а концентрация праймеров 10 µM (микроМоль) на реакцию. Постановка реакции была проведена согласно протоколу к диагностическому набору. Был проведен 1 цикл в режиме: 50 °C–15 мин, 95 °C–5 мин и 45 циклов амплификации в режиме: 90 °C–30 сек, 60 °C–60 сек. РВ-ПЦР проводили в приборе Rotor Gene 6000 (Software).

Совместно со специалистами Шведского национального ветеринарного университета (SVA), Упсала изучено филогенетическое дерево изолята вируса болезни Ньюкасла. При скрининге материалов Гиссарского района в ПЦР получены положительные результаты с обнаружением специфических продуктов 300 пар оснований, что свидетельствует о наличии РНК вируса БН в исследованных образцах. После выделения вируса, проведено секвенирование фрагмента гена, кодирующего белок слияния (F-протеин). В результате секвенирования расшифрована последовательность нуклеотидов, которая включает сайт расщепления белка слияния, что важно для выявления его патогенности.

Для секвенирования был выбран участок генома вируса болезни Ньюкасла, содержащий сегмент F-гена (GGRRQKRFIGAV). По нуклеотидной последовательности данного участка можно воссоздать аминокислотную последовательность сайта протеолитического расщепления белка слияния, которая является основным маркером патогенности для вируса болезни Ньюкасла.

Для определения филогенетических взаимоотношений секвенированного вируса осуществлен анализ имеющихся в международной базе данных полных нуклеотидных последовательностей F-гена (GGRRQKRFIGAV) ПМБ-1. Гиссарский изолят вируса Ньюкасла по антигенному варианту совпадает на 98 % с штаммами стран южной Азии, таких как Шри Ланка и Пакистан.

Культуральные свойства. Штамм ВБН AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 при культивировании на монослое первичной культуры клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) вызывает цитопатическое действие (ЦПД) на 2-4 сутки (температура культивирования 37°C в атмосфере 5% CO₂).

Патогенность для человека. Штаммы вируса болезни Ньюкасла не являются патогенными для человека.

Патогенность для птицы. Штамм ВБН AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 относится к умереннопатогенным вариантам вируса болезни Ньюкасла.

Патогенность для млекопитающих. Штамм не проявляет патогенности для млекопитающих.

Для длительного хранения штамм необходимо лиофилизировать с использованием в качестве защитной среды раствора желатина и сахарозы (САЖ). Лиофилизация с добавлением САЖ в соотношении 1:4 позволяет сохранить стабильную инфекционную активность вируса в течение не менее 2 лет при хранении на -70°C .

Для культивирования штамма в культуре клеток используют следующие питательные среды: Игла МЭМ, Игла МЭМ $\times 2\text{ABK}$, среда 199, ДМЭМ, содержащие 2 мкг/мл трипсина, 2 ммоль/л глутамина, 100 мкг/мл пенициллина и 100 МЕ/мл стрептомицина.

Таким образом, антиген AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 позволяет выявлять 100% сывороток, содержащих антитела к современным вариантам ВБН. Антиген на основе штамма Ла Сота, который ранее циркулировал и относится.

Пример 1. Ретроспективная серодиагностика сывороток диких птиц.

Проведено скрининговое исследование сывороток крови от диких птиц с использованием различных антигенов:

1. Антиген предлагаемого штамма AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6.

2. Антиген на основе штамма Ла Сота.

Было исследовано 30 образцов сывороток крови диких птиц. В таблице представлены результаты сравнительного исследования сывороток в РТГА с антигенами различных штаммов. Положительными считали сыворотки с титром ≥ 32 .

При использовании антигена для диагностики вируса болезни Ньюкасла на основе штамма Ла - Сота положительными оказались 47% сывороток, а на основе антигена предлагаемого штамма AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 - 100% (см. таблицу).

Значения обратных титров положительных сывороток крови диких птиц на наличие антител к вирусу болезни Ньюкасла в РТГА

Сыворотка	Антиген AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6	Антиген La Sota
1.	≥ 2048	128
2.	1024	64
3.	512	64
4.	128	<16
5.	256	<16
6.	256	<16
7.	512	64
8.	256	32
9.	256	<16
10.	512	16
11.	128	32
12.	1024	16
13.	512	32
14.	256	32
15.	512	<16

Поликлональные сыворотки от диких птиц проявляют большее сродство к антигену предлагаемого штамма, что позволяет с большей достоверностью детектировать наличие антител. Таким образом, антиген AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 позволяет выявлять 100% сывороток, содержащих антитела к современным вариантам ВБН. Антиген на основе штамма Ла Сота, который ранее циркулировал и относится.

Уникальные биологические свойства предлагаемого штамма обеспечивают технологическое преимущество по сравнению с другими, поскольку позволяют набирать антиген высокого качества в большом количестве. Следует добавить, что предлагаемый штамм AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6 может быть использован совместно с другими известными для более детального исследования антигенных характеристик вновь выделяемых штаммов ВБН и серодиагностики сывороток крови животных.

Пример 2. Оценка уровня популяционного иммунитета домашних птиц на птицеферме после вакцинации.

Для оценки уровня популяционного иммунитета была собрана репрезентативная случайная выборка сывороток крови у кур ($n=150$).

Была проведена реакция торможения гемагглютинации с антигеном предлагаемого AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6. Реакцию проводили в U-образных иммунологических планшетах с 5% суспензией эритроцитов петуха.

В результате все сыворотки имели титр в РТГА 1/160-1/320 с антигеном предлагаемого штамма. Этот титр является диагностическим. Таким образом, по результатам РТГА с антигеном предлагаемого штамма уровень популяционного иммунитета составил 100%. Это позволяет заключить, что вакцинация позволяет сформировать популяционный иммунитет у промышленного поголовья кур к современному «дикому» штамму AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6. При возможном заносе в подобное стадо домашней птицы дикого штамма вакцинация позволит с большой вероятностью защитить поголовье. При этом подобное заключение было сделано в исследованиях с использованием антигена на основе предлагаемого штамма AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6.

Формула изобретения

Штамм вируса болезни Ньюкасла для использования при диагностике болезни Ньюкасла в РТГА, депонирован в Национальный центр коллекции патогенных микроорганизмов Институт

проблем биологической безопасности Таджикской академии сельскохозяйственных наук под регистрационным номером: № 2-2018. *AAvA1Chicken Tadjikistan Gissor 6*.

Компьютерный набор: Ризоева С.Р.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		