



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 7/00 (2006.01); A61K 39/275 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016146044, 23.11.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.11.2016

Дата регистрации:
19.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.11.2016

(45) Опубликовано: 19.03.2018 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

601125, Владимирская обл., Петушинский район,
пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр.
1, ФГБНУ ФИЦВиМ

(72) Автор(ы):

Стрижакова Ольга Михайловна (RU),
Новикова Марина Борисовна (RU),
Сальников Николай Игоревич (RU),
Усадов Тимур Равильевич (RU),
Живодеров Сергей Петрович (RU),
Луницин Андрей Владимирович (RU),
Сидлик Марина Валерьевна (RU),
Лыска Валентина Маркеловна (RU),
Васильев Александр Павлович (RU),
Шкаев Артем Эхкамович (RU),
Болгова Марина Васильевна (RU),
Куриннов Виктор Васильевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный
исследовательский центр вирусологии и
микробиологии" (ФГБНУ ФИЦВиМ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2560569 C2, 20.08.2015. KZ
21776 B, 15.08.2011. ZRO KH. ET AL. A
sheeppox outbreak in Morocco: isolation and
identification of virus responsible for the new
clinical form of disease. BMC Veterinary
research, 2014, V.10, P.31-38. BOUMART Z.
ET AL. Comparative innocuity and efficacy of
live and inactivated sheeppox vaccines. BMC
Veterinary (см. прод.)

(54) Штамм "Калмыкия-16" вируса оспы овец для вирусологических, молекулярно-генетических, мониторинговых исследований, изготовления вакцин и диагностических препаратов

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к вирусологии и ветеринарии. Предложен штамм "Калмыкия-16" вируса оспы овец семейства *Roviridae* рода *Capripoxvirus*, выделенный от больной овцы во время эпизоотии болезни в Республике Калмыкия и депонированный в Государственной коллекции микроорганизмов Государственного научно-исследовательского

института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии под номером 3160. Предложенный штамм может быть применен в качестве референс-штамма при проведении вирусологических, молекулярно-генетических, мониторинговых исследований, изготовлении вакцин и диагностических препаратов. 1 ил., 2 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):
research, 29.06.2016, V.12, P.133-138.

R U 2 6 4 7 7 6 8 C 1

R U 2 6 4 7 7 6 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 7/00 (2006.01); *A61K 39/275* (2006.01)(21)(22) Application: **2016146044, 23.11.2016**(24) Effective date for property rights:
23.11.2016Registration date:
19.03.2018

Priority:

(22) Date of filing: **23.11.2016**(45) Date of publication: **19.03.2018** Bull. № 8

Mail address:

**601125, Vladimirskaia obl., Petushinskij rajon, pos.
Volginskij, ul. Akademika Bakulova, str. 1, FGBNU
FITSViM**

(72) Inventor(s):

**Strizhakova Olga Mikhajlovna (RU),
Novikova Marina Borisovna (RU),
Salnikov Nikolaj Igorevich (RU),
Usadov Timur Ravilevich (RU),
Zhivoderov Sergej Petrovich (RU),
Lunitsin Andrej Vladimirovich (RU),
Sidlik Marina Valerevna (RU),
Lyska Valentina Markelovna (RU),
Vasilev Aleksandr Pavlovich (RU),
Shkaev Artem Ekhkamovich (RU),
Bolgova Marina Vasilevna (RU),
Kurinnov Viktor Vasilevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Federalnyj
issledovatel'skij tsentr virusologii i mikrobiologii"
(FGBNU FITSViM) (RU)****(54) "KALMYKIA-16" STRAIN OF SHEEP POX VIRUS FOR VIROLOGICAL, MOLECULAR-GENETIC,
MONITORING STUDIES, PRODUCTION OF VACCINES AND DIAGNOSTIC PREPARATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: "Kalmykia-16" strain of the sheep-
pox virus of the Poxviridae family of the Capripoxvirus
genus, isolated from a sick sheep during the epizootic
disease in the Republic of Kalmykia and deposited in
the State Collection of Microorganisms of the State
Research Institute of Veterinary Virology andMicrobiology of Rosselkhozakademia under number
3160, is proposed.EFFECT: strain can be used as a reference strain
for virological, molecular genetic, monitoring studies,
manufacturing of vaccines and diagnostic preparations.

1 dwg, 2 tbl, 3 ex

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и касается штамма вируса оспы овец (ВОО), и может быть использовано в научно-исследовательских институтах и диагностических центрах в качестве референс-штамма при проведении вирусологических, молекулярно-генетических, мониторинговых исследований, изготовления вакцин и диагностических препаратов.

Оспа овец (ОО) - острое контагиозное вирусное заболевание, характеризующиеся лихорадкой папулезно-пустулезными поражениями эпителиальных клеток кожи и слизистых оболочек. Согласно принятой классификации вирус оспы овец относится к семейству Poxviridae род Capripoxvirus.

Вирус является этиологическим агентом высококонтагиозного заболевания, характеризующегося лихорадкой и пузырьково-пустулезной сыпью. Оспа овец регистрируется на всех континентах, за исключением Австралии и Океании (2). В Российской Федерации оспу овец регистрируют эпизодически, в частности 2015 году нотифицировано 9 вспышек (Республике Дагестан, Приморский край, Республика Калмыкия) (8).

Основными путями заражения животных является контактный и воздушно-капельный путь (1). Источник и резервуар инфекции - больные овцы. Передача вируса осуществляется в основном алиментарным путем и через механических переносчиков.

Оспа овец регистрируется во все сезоны года и имеет выраженную тенденцию к увеличению территориального охвата. Заболеваемость при оспе овец колеблется от 20 до 90%, а летальность в зависимости от породы, возраста животных и формы течения болезни может достигать 5-100%. Возбудитель оспы овец состоит в близком генетическом, антигенном и серологическом родстве с возбудителями оспы коз и нодулярного дерматита крупного рогатого скота, но по патогенности они обладают видовой специфичностью (3-7).

Целью данного изобретения является получение нового штамма вируса оспы овец, обладающего стабильными антигенными свойствами для использования в качестве референтного штамма при проведении вирусологических, молекулярно-генетических, мониторинговых исследований и изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

Поставленная цель достигнута путем выделения вируса оспы овец от больной овцы, принадлежащей КФК «Эрдня» Лаганского района Республики Калмыкия во время эпизоотии болезни. Выделенный вирус является новым штаммом возбудителя, выделенным на территории РФ. Полученный вирулентный штамм обозначен как штамм «Калмыкия 16» и депонирован в Государственной Коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН под №3160.

Новый штамм «Калмыкия-16» характеризуется следующими признаками и свойствами.

Морфологические свойства. При электронно-микроскопических исследованиях в вирусодержащем материале обнаружены вирусные частицы, размером 300×250×200 нм, морфологически тождественные представителям рода Capripoxvirus семейства Poxviridae.

Культуральные свойства. Штамм «Калмыкия -16» размножается в первичных культурах почки и тестикул ягнят, а также в перевиваемой культуре клеток ПО. Репродукция вируса сопровождается цитопатическим действием, приводящим к образованию характерных «оспенных» поражений на 3-4 сутки культивирования. В культурах гетерологичного происхождения (ПС, МДБК, VERO) без предварительной адаптации вирус не размножается.

Инфекционная активность. Обладает высокой инфекционной активностью, при внутрикожном титровании на овцах титр вируса составляет $10^{5,1}$ ИД/см³, в культуре клеток ПО после адаптации накапливается $10^{4,5-5,0}$ ТЦД₅₀/см³.

Антигенные свойства. Вызывает образование вируснейтрализующих антител.

Гемагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства. Не обладает.

Патогенность для человека. Не патогенен.

Патогенные свойства. Штамм патогенен для овец всех пород и возрастных групп.

Контагиозность. Штамм контагиозен для овец. Интактные овцы заболевают оспой овец при совместном содержании с инфицированными животными.

Контаминация бактериями, грибами, микоплазмами и посторонними вирусами.

Штамм не контаминирован бактериями, грибами, микоплазмами и посторонними вирусами.

Способ и срок хранения, периодичность пассажей. Штамм хранят при минус 40°C и «освежают» на овцах. Периодичность освежения штамма один раз в 10 лет.

Молекулярно-генетическая характеристика.

Нуклеотидная последовательность гена GPCR (ген белка, относящегося к суперсемейству семиспиральных хемокиновых рецепторов) на 100% идентична последовательностям штаммов «Srinagar/2000 P-5», «NISKHI», «Odisha/16», «Srinagar/2000 P-40» вируса оспы овец.

Сущность изобретения поясняется следующими примерами.

Пример 1. Изучение биологических свойств штамма ВОО «Калмыкия -16» (проверка патогенности для овец).

При внутрикожном заражении в дозе 500 ИД₅₀/0,5 см³ инкубационный период составлял 3-5 дней. У 100% зараженных овец наблюдали угнетение, отсутствие аппетита, потерю веса и характерные оспенные поражения. У 30% зараженных животных наблюдали генерализованную форму течения болезни. Летальность составила 14%. При доброкачественном течении болезни и отсутствии осложнений наблюдали выздоровление, которое наступало на 21-28 сутки.

Пример 2. Штамм «Калмыкия - 2016» используют для получения гипериммунной сыворотки крови для диагностических исследований.

Гипериммунную сыворотку используют в качестве реагента для вирусологических реакций при обнаружении как вирусного антигена в пробах патологического материала от больных оспой овец и павших животных, а также в качестве положительного контроля в серологических реакциях.

Иммунизировали две группы овец: овцам первой группы подкожно вводили вирусвакцину против оспы овец сухую культуральную (штамм НИСХИ, клон Б-5/96) в прививной дозе. Через 14 суток овцам внутрикожно (в несколько точек) вводили по 500 ИД₅₀/0,5 см³ эпизоотический штамм ВОО штамма «Калмыкия -16».

Во 2 группу вошли овцы реконвалесценты. На 40 сутки с момента клинических проявлений болезни овцам вводили внутрикожно ВОО штамма «Калмыкия -16» в дозе 500 ИД₅₀/0,5 см³.

Динамику накопления антител в крови иммунизированных животных определяли РДП и РН (таблица №1).

Таблица № 1.

Определение активности сывороток при различных схемах иммунизации
овец вирусом оспы овец штамм «Калмыкия -16»

Группа животных	Сутки введения	Способ введения	Активность сывороток	
			РДП	РН
Вакцинированные	1	п/к	0	0
	14	в/к	0	1:2
	28	-	1:2	1:8
Реконвалесценты	1	в/к	0	0
	40	в/к	1:2	1:8
	54	-	1:2	1:32

Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что на 14 сутки после вакцинации у животных 1 группы титр ВНА составил 1:2. После внутрикожного введения эпизоотического вируса штамм Калмыкия-16 у вакцинированных овец, через 14 суток, активность сывороток в РДП была в разведении 1:2, а титр ВНА увеличился до 1:8.

При иммунизации животных группы №2 (реконвалесценитов) также отмечено значительное увеличение специфической активности сыворотки крови. Титр антител в РДП у переболевших животных достигал значений 1:2, в РН 1:8. После дополнительного внутрикожного введения эпизоотического вируса титры антител в РДП у этих животных оставались примерно на том же уровне, а в РН они возросли и составляли 1:32.

Результаты проведенных исследований показали, что сыворотку крови с высокой активностью можно получать при иммунизации эпизоотическим штаммом ОО «Калмыкия 16» вакцинированных и переболевших овец.

Пример 3. Секвенирование и филогенетический анализ гена GPCR вируса штамма «Калмыкия-16» вируса оспы овец.

Методом нуклеосорбции провели выделение ДНК из культурального материала, содержащего вирус оспы овец, штамм «Калмыкия-16». С использованием 2 пар праймеров GPCR1-GPCR2 и GPCR3-GPCR4 амплифицировали 2 фрагмента гена GPCR (ген белка, относящегося к суперсемейству семиспиральных хемокиновых рецепторов) вируса штамма «Калмыкия-16». Данные фрагменты секвенировали методом Сэнгера с использованием генетического анализатора «ABB1 PRISM 3130» (Applied Biosystems, США) (Таблица 2). В результате получена нуклеотидная последовательность фрагмента гена GPCR размером 1000 п.о.: 5' -

ttattagtacaattctcagtagaatttcaacaaataaaaataatgttacaacgccttaacttatgaaaatacagacagcaatat
 ctaattataaaacagcatataataaacctattacagcgatgattatgatgattatgaagtgaacatagtcgatatcccaca
 ctgtgatgatgggtgtataactacaagtttggacttattactttatatttaactatattctttcttgattatttggaaatataattg
 5 tgtaactgttcttcgtaaataaagataaaaacgatacaggatatattttgcttaatttgacattgtctgatttaatttcgtttt
 ggtgtttccttttaatttatacaatagtagtaaacatggagtttgggagattgttgtgtaaattcaaagctatgtttact
 ttgttggtttttacaatagcatgtcatttataacattgatgagtagtagatagctatagttaccagtaaaatcaat
 10 aacgataaggacaaaacaatacgggaattgtacttagtatgggtggttggattgtctcaattattgaatcctttccaataatgtt
 atttatgaacaaaaaaagtatatggaataacacattgtcatgtattttataacgataatgcaaaaatttggaaattatttata
 aattttgaaataaacatatttggaaatgattataaccgctaattattttgctatattgttattataaaatcttaataactttaaaacat
 15 cacaacaaagaataagaaagccataaagatgggtgttttaattgttatctgttcagtagttttactcccatttagtgaac
 tgtatttgttcatcgttgtatttgttaaattgttttagtggtgattgtcattaagattgtcaaccttgacagttcatgtaactgaa
 attgtgtctctatgtcattgttttatcaaccactaatttatgcgtttttagtagagaatttact – 3'.

таблица № 2

Праймеры, использовавшиеся для амплификации гена GPCR вируса оспы
 овец, штамм «Калмыкия-16»

название праймера	нуклеотидная последовательность 5' → 3'	размер ампли- кона
GPCR 1	ack ctt agw aca gtt agt agc	631 п.о.
GPCR 2	ttg aga caa tcc aaa cca cc	
GPCR 3	tat gtt tta ctt tgt tgg ttt	649 п.о.
GPCR 4	tta tcc rat gct aat act ac	

С помощью программ «Bio Edit 6.0» и «Mega 5.0» провели выравнивание и
 филогенетический анализ полученной нуклеотидной последовательности с
 последовательностями гена GPCR штаммов вируса оспы овец, представленных в базе
 данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Филогенетическое дерево строили по методу Максимальной экономии, достоверность
 распределения последовательностей по группам оценивали бутстрэп-анализом со 100-
 кратной повторностью (Рисунок 1).

На дереве видно, что изолят из Калмыкии находится в кластере штаммов вируса
 оспы овец, выделенных в Индии и Казахстане. Наибольшая степень нуклеотидной
 идентичности (100%) наблюдается со штаммами «Srinagar/2000 P-5», «NISKHI», «Odisha/
 16», «Srinagar/2000 P-40».

Источники информации

1. Hailat N., An outbreak of sheep pox associated with unusual winter conditions in Jordan./
 N.Hailat, O.Al-Rawashdeh, S.Lafi and Z.Al-Rawashdeh // Trop.Anim.Health Prod. 1994. V. 26.

P. - 79-80.

2. Garner M.G., The extent and impact of sheep pox and goat pox in the state of Maharashtra, India./ M.G. Garner, S.D. Sawarkar, E.K. Brett, J.R. Edwards, V.B. Kulkarni, V.B. Boyle and S.N.Singh // Trop.Anim.Health Prod.2000. V. 32. P. 205-223.

5 3. Cam V.M. Control of capripoxvirus infections / V.M. Carn, // Vaccine. - 1993. - V. - 11. - P. 1275-1279.

4. Subba Rao M.V., Antigenic relationships among sheep pox, goat pox and contagious pustular dermatitis viruses.. / M.V. Subba Rao and B.S. Malik, // Acta virol. 1984., 28. P. - 380-387.

10 5. Kitching R.P., Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses / R.P. Kitching and W.P.Taylor. // Trop.Anim.Health Prod. 1985. 17. - P. - 64-74.

6. Gershon P.D., Physical characterization of genome of cattle of capripoxvirus / P.D. Gershon and D.N. Black, // Virology. - 1987. - V. - 160. - P. - 473-476.

7. Gershon P.D., A comparison of the genomes of capripoxvirus isolates of sheep, goats, and cattle/ P.D. Gershon and D.N. Black, // Virology. - 1988. - V. - 164. - P. - 341-349.

15 8. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI

(57) Формула изобретения

Штамм «Калмыкия-16» вируса оспы овец семейства Poxviridae род Capripoxvirus, депонированный в Государственной Коллекции микроорганизмов Государственного
20 научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии под №3160, для проведения вирусологических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований, изготовления вакцин и диагностических препаратов.

25

30

35

40

45

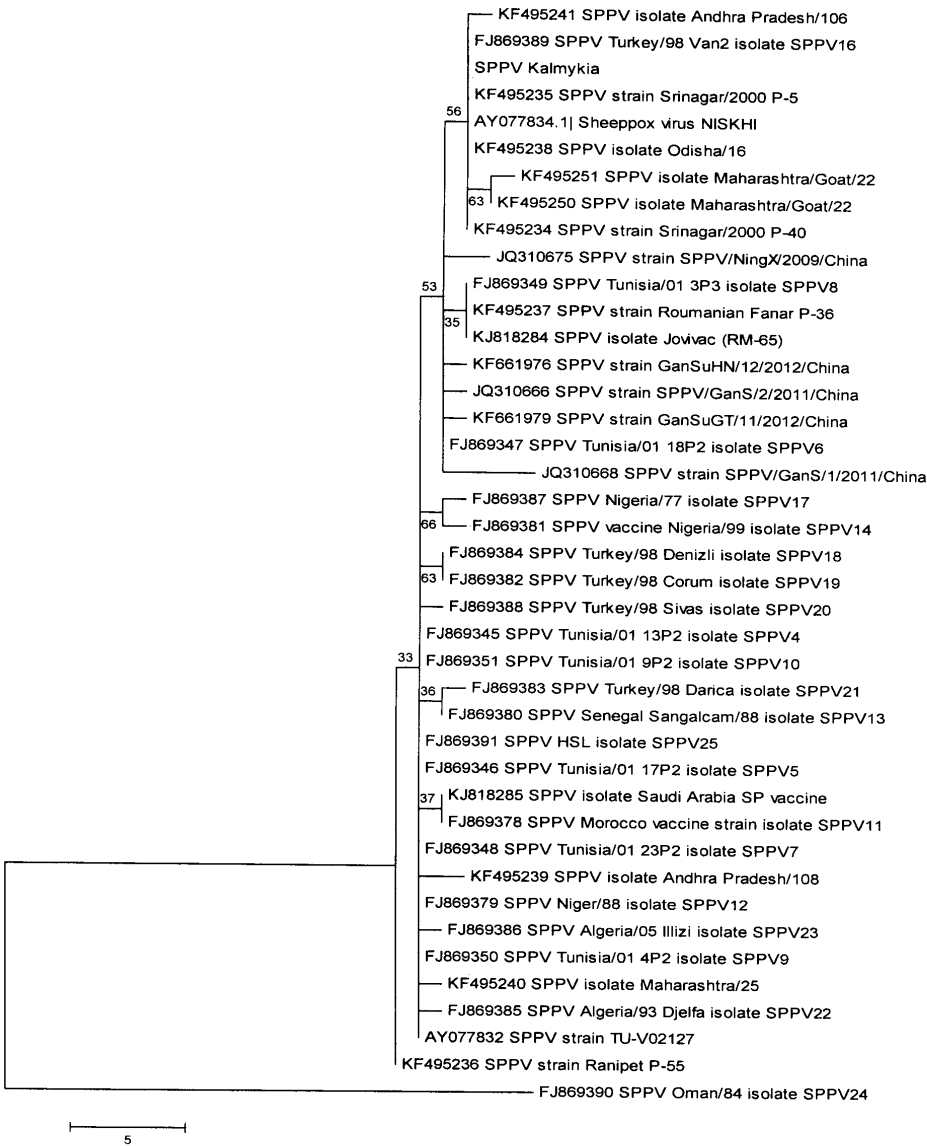


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа гена GPCR вируса оспы овец.