

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19)

RU (11)

2 647 757⁽¹³⁾ C1

(51) МПК
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/275 (2006.01)

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: 2016145397, 21.11.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 21.11.2016Дата регистрации:
 19.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.11.2016

(45) Опубликовано: 19.03.2018 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

601125, Владимирская обл., Петушинский район,
 п. Волгинский, ул. Академика Бакурова, стр.
 1, ФГБНУ ФИЦВиМ

(72) Автор(ы):

Живодеров Сергей Петрович (RU),
 Сальников Николай Игоревич (RU),
 Усадов Тимур Равильевич (RU),
 Кольцов Андрей Юрьевич (RU),
 Моргунов Сергей Юрьевич (RU),
 Луницин Андрей Владимирович (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.БИРЮЧЕНКОВА М.В. и др. Результаты
 генодиагностики нодулярного дерматита в
 Дагестане и Чеченской Республике - первое
 официальное подтверждение болезни на
 территории Российской Федерации.
 Ветеринария сегодня. 2015, т.4, №. 15, с. 43-
 45. РЯБИКИНА О.А. и др. Нодулярный
 дерматит крупного рогатого скота (обзор
 литературы). (см. прод.)

(54) Штамм "Волгоградский" вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота для вирусологических, молекулярно-генетических, мониторинговых исследований, изготовления вакцин и диагностических препаратов

(57) Реферат:

Изобретение относится к вирусологии и ветеринарии. Предложен штамм вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота «Волгоградский» семейства Poxviridae, род Capripoxvirus, выделенный из патологического материала от больных коров из Волгоградской области и депонированный в Государственной коллекции микроорганизмов Всероссийского

научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии под №3161. Предложенный штамм может быть использован для проведения вирусологических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований, изготовления вакцин и диагностических препаратов. 1 табл., 3 пр.

RU 2647757 C1

(56) (продолжение):
Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2015, т. 4, №. 28, с. 45-52. МИЩЕНКО А.В. и др.
Проблема нодулярного дерматита крупного рогатого скота. Ветеринария Кубани. 2015, №.5,
с. 3-6.

R U 2 6 4 7 7 5 7 C 1

R U 2 6 4 7 7 5 7 C 1

R U 2 6 4 7 7 5 7 C 1

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11) 2 647 757⁽¹³⁾ C1

(51) Int. Cl.
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/275 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

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

(21)(22) Application: 2016145397, 21.11.2016

(24) Effective date for property rights:
21.11.2016

Registration date:
19.03.2018

Priority:

(22) Date of filing: 21.11.2016

(45) Date of publication: 19.03.2018 Bull. № 8

Mail address:
601125, Vladimirskaya obl., Petushinskij rajon, p.
Volginskij, ul. Akademika Bakulova, str. 1, FGBNU
FITSViM

(72) Inventor(s):
Zhivoderov Sergej Petrovich (RU),
Salnikov Nikolaj Igorevich (RU),
Usadov Timur Ravilevich (RU),
Koltsov Andrej Yurevich (RU),
Morgunov Sergej Yurevich (RU),
Lunitsin Andrej Vladimirovich (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Federalnyj
issledovatelskij tsentr virusologii i mikrobiologii"
(FGBNU FITSViM) (RU)

(54) VOLGOGRADSKY STRAIN OF CATTLE NODULAR DERMATITIS VIRUS FOR VIROLOGICAL,
MOLECULAR-GENETIC, MONITORING STUDIES, PRODUCTION OF VACCINES AND DIAGNOSTIC
PREPARATIONS

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: cattle nodular dermatitis virus strain Volgogradsky, of Poxviridae family, Capripoxvirus genus, is recovered from pathological material taken from infected cows in the Volgograd Region and deposited in the Collection of Microorganisms of the

All-Russian Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology, under No. 3161.

EFFECT: strain can be used for virological, molecular-genetic and monitoring studies, production of vaccines and diagnostic preparations.

1 tbl, 3 ex

R U 2 6 4 7 7 5 7 C 1

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии, в частности к штаммам вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота, 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.

Согласно принятой классификации вирус нодулярного дерматита крупного рогатого скота относится к роду *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae* [3].

Нодулярный дерматит крупного рогатого скота (далее - нодулярный дерматит КРС) - это болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узлов (буగров), поражением глаз и слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов [1, 2].

Нодулярный дерматит КРС относят к особо опасным болезням животных, способным вызывать эпизоотии и наносить значительный экономический ущерб. В соответствии с новой классификацией он включен в список болезней МЭБ, подлежащих обязательному уведомлению (нотификации), в категорию «Болезни и инфекции крупного рогатого скота» [4, 5, 6].

Целью данного изобретения является получение нового штамма вируса нодулярного дерматита КРС, обладающего стабильными культуральными и антигенными свойствами для использования в качестве референс-штамма при проведении вирусологических, молекулярно-генетических, мониторинговых исследований и изготовления диагностических и вакцинальных препаратов.

Поставленная цель достигается путем выделения вируса из патологического материала (струпья) от больных коров из Волгоградской области. Вирус выделили с использованием культур клеток.

Штамм является новым, ранее не известным, выделенным на территории РФ и обозначен как штамм «Волгоградский».

Штамм депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии под №3161.

Штамм «Волгоградский» характеризуется следующими признаками и свойствами:
1) морфологические свойства. При электронно-микроскопических исследованиях в вирусодержащем материале обнаружены вирусные частицы размером 300×250×200 нм, морфологически тождественные представителям рода *Capripoxvirus* семейства *Poxviridae*.

2) культуральные свойства. Штамм «Волгоградский» размножается в перевиваемой культуре клеток почки теленка (MDBK). Репродукция вируса сопровождается цитопатическим действием, приводящим к полной деструкции монослоя на 3-4 сут культивирования.

3) инфекционная активность. Обладает среднего уровня инфекционной активностью, накапливается в культуре клеток MDBK в титрах 5,0-5,5 lg ТЦД₅₀/см³.

4) способ выращивания. Штамм культивируют в монослое перевиваемой культуры клеток MDBK. При оптимальных условиях максимальное накопление достигается через 72-96 ч культивирования. В качестве поддерживающей среды используют среду Игла-МЭМ с 2% фетальной телячьей сыворотки.

5) Иммуногенные свойства. Вызывает образование вируснейтрализующих антител.
6) Гемаглютинирующие свойства: не обладает.
7) Патогенность для человека: не патогенен.
8) Патогенные свойства. Штамм патогенен для крупного рогатого скота всех пород

и возрастных групп. При экспериментальном заражении взрослых коров вызывает повышение температуры тела (41°-41,5) и потерю веса, а также характерные оспенные поражения на коже. При отсутствии осложнений выздоровление наступает на 30-40 сут. У молодняка наблюдается более тяжелое течение.

5 9) Контагиозность. Штамм контагиозен для крупного рогатого скота. Интактные животные заболевают нодулярным дерматитом при совместном содержании с инфицированными животными.

10 10) Трансмиссивность. Штамм передается кровососущими насекомыми (оводы, слепни, мокрецы).

11) Контаминация бактериями, грибами, микоплазмами и посторонними вирусами. Штамм не контаминирован бактериями, грибами, микоплазмами и посторонними вирусами.

12) Способ и срок хранения, периодичность пассажей. Штамм хранят при минус 40°C и «освежают» пассированием в культуре клеток MDBK. Периодичность освежения штамма один раз в 10 лет.

Сущность изобретения поясняется следующими примерами.

Пример 1. Изучение биологических свойств штамма «Волгоградский»

Таблица 1 – Сохраняемость вируса в процессе культивирования в культуре клеток MDBK

Характеристика вируса	Доза заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Накопление в процессе культивирования			
		2 пассаж ТЦД ₅₀ /см ³	5 пассаж ТЦД ₅₀ /см ³	10 пассаж ТЦД ₅₀ /см ³	20 пассаж ТЦД ₅₀ /см ³
Штамм «Волгоградский» нативный	0,05	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5
	0,005	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5
Штамм «Волгоградский» лиофилизованный	0,05	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5
	0,005	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5

Примечание: доверительный интервал - 95%.

Как видно из Таблицы 1, штамм «Волгоградский», как нативный, так и лиофилизованный, стабилен при длительном пассировании в культуре клеток MDBK. Множественность заражения 0,05-0,005 ТЦД₅₀/кл. Стабильность штамма обеспечивает возможность использования вирусного материала для конструирования инактивированных вакцин и диагностических препаратов.

Пример 2. Использование вируса нодулярного дерматита КРС, штамм «Волгоградский», для приготовления инактивированной вакцины против нодулярного дерматита КРС.

Для получения производственного вируса отбирали 1-2-дневную культуру клеток MDBK с полным равномерным монослоем, выращенную на культуральных пластиковых одноразовых матрасах с посадочной площадью 225 см³. Из матрасов удаляли ростовую среду и в каждый вносили по 100 мл поддерживающей питательной среды. Затем вносили вирус, множественность заражения при этом составляла 0,05-0,005 ТЦД₅₀/кл. Матрасы с инфицированной культурой помещали в термостат. Выращивание вируса проводили при температуре (37,0±0,5)°С в течение 72-96 ч до проявления характерных цитопатических изменений и поражении 90-100% клеточного монослоя. Затем вирусную суспензию сливали, объединяли и хранили при температуре (-20,0±4,0)°С. Для приготовления инактивированной вакцины использовали вирус с активностью 5,0-5,5

$\lg TCD_{50}/\text{см}^3$. Биологическую активность вируса определяли титрованием на монослойной культуре клеток MDBK. Инактивацию вируса проводили (3-пропиолактоном в разведении 1:4000, поддерживая pH раствора в пределах 7,0-7,4. Вирус инактивировали при комнатной температуре (21 ± 4)°С в течение 2 ч на магнитной мешалке, а затем при 2-6°С в течение ночи (12-14 ч). Полноту инактивации вируса в полуфабрикате проверяли путем проведения 3 пассажей инактивированного вируса в культуре клеток ТК. Для этого в 3 матраса с посадочной площадью 25 см³ с монослоем 1-2-суточной культуры клеток MDBK вносили по 1 см³ вируса в разведении 1:10, выдерживали 20 мин при температуре ($37,0 \pm 0,5$)°С, затем монослой отмывали питательной средой, в матрасы заливали поддерживающую среду и инкубировали в течение 5 сут. Для проведения пассажей испытуемую культуру клеток кратковременно замораживали-оттаивали, содержимое матрасов в разведении 1:10 переносили в 2-дневную культуру клеток MDBK с полным равномерным монослоем и инкубировали еще 5 дней. Полноту инактивации оценивали по отсутствию ЦПД в культуре клеток MDBK на третьем пассаже вируса. К инактивированной суспензии вируса добавляли 6%-ный раствор гидроокиси алюминия (ГОА) до конечной концентрации 5-10 мг/мл, тщательно перемешивали и оставляли при температуре (2-6)°С для адсорбции вирусного антигена. Через 24 ч осторожно, не взбалтывая, декантировали 1/3 часть надосадка, доливали инактивированную вирусную суспензию до первоначального объема, тщательно перемешивали и выдерживали еще 24 ч. Приготовленная таким образом вакцина представляла собой суспензию бледно-розового цвета с белым осадком.

Проверку иммуногенных свойств вакцины осуществляли на телятах. До иммунизации и через 21 день после вакцинации от животных отбирали кровь и исследовали сыворотку на наличие вируснейтрализующих (ВН) антител в реакции нейтрализации (РН). РН проводили по стандартной методике со 100-300 ТЦД₅₀ вируса микрометодом в планшетах (разведение сывороток с 1:2 до 1:256) с использованием культуры клеток MDBK. Вакцина вызывала образование ВН-антител у испытуемых животных в титрах 1:8-1:16.

Пример 3. Приготовление культурального специфического антигена вируса нодулярного дерматита КРС штамм «Волгоградский».

Монослойную культуру клеток MDBK, выращенную в матрасах с посадочной площадью 225 см³, заражали вирусом нодулярного дерматита штамм «Волгоградский» с множественностью заражения 0,05 ТЦД₅₀/кл. Вирус культивировали при ($37,0 \pm 0,5$)°С, поддерживая pH среды в пределах 7,0-7,4 в течение 24-48 ч до появления 30% ЦПД. Культуральную жидкость удаляли и монослой отмывали двукратно ФБР. Клетки снимали с пластика механически. Отделившиеся клетки собирали в небольшом количестве физиологического раствора, осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Затем клетки лизировали добавлением дистиллированной воды в объеме, равном 1/100 исходного объема вируссодержащей жидкости. Полученный материал дважды замораживали-оттаивали и обрабатывали ультразвуком 2 раза по 12 мкм в течение 1 мин с интервалом 1 мин. Суспензию с клеточным дебрисом снова замораживали-оттаивали и удаляли клеточный детрит центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин.

Полученный осветленный лизат инактивировали β-пропиолактоном. С этой целью в 50 мл надосадка лизированных клеток, содержащего антиген вируса нодулярного дерматита, вносили 0,04 мл β-пропиолактона и выдерживали 18 ч при ($4,0 \pm 2,0$)°С.

Полноту инактивации антигена проверяли в 3 последовательных пассажах в чувствительной культуре клеток MDBK. Полученный антиген не содержал остаточной инфекционности и обладал активностью в реакции диффузионной преципитации 1:2-1:4.

⁵ Источники информации

1. Гуненков В.В. Заразный узелковый дерматит крупного рогатого скота [Текст] / В.В. Гуненков // Сборник науч. тр. ВГНКИ. - М., 2005. - Т. 66. - С. 46-54.
2. Инфекционная патология животных [Текст]; под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. - М.: Академкнига, 2006. - Т. 1. - С. 782-786.
3. Кодекс здоровья наземных животных МЭБ. Т. 1. Гл. 1.2. Критерии включения болезней, инфекций и инфестаций в список МЭБ. - 23 изд. - Paris, 2014. - С. 5.
4. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота в Республике Северная Осетия-Алания / В.Н. Герасимов, А.В. Луницин, Н.И. Сальников, А.Е. Гогин, Н.А. Еремеев, Д.В. Колбасов // Ветеринария. - 2016. - №4. - С. 11-14.
5. Clinico-histopathological findings and PCR based diagnosis of lumpy skin disease in the Sultanate of Oman [Текст] / M. Body, K. P. Singh, M. H. Hussain [et al.] // Pakistan Veterinary J. - 2012. - Vol. 32. - P. 1-5.
6. Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel, July 2006 [Текст] / J. Brenner, M. Haimovitz, E. Oron [et al.].// Isr. Vet. Med. J. - 2006. - Vol. 61. - P. 73-77.

(57) Формула изобретения

Штамм «Волгоградский» вириуса нодулярного дерматита крупного рогатого скота семейства Poxviridae род Capripoxvirus, депонированный в Государственной коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии под №3161 для проведения вирусологических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований, изготовления вакцин и диагностических препаратов.

³⁰

³⁵

⁴⁰

⁴⁵