



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

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

(21) 1901371

(22) 03.12.2019

(46) Бюл.164, 2020

(71)(73) Институт проблем биологической безопасности Академии сельскохозяйственных наук Таджикистана (TJ)

(72) Косумбеков М.И. (TJ); Джумаев Ш.Н. (TJ); Махмудов К.Б. (TJ); Турдиев Ш.А. (TJ); Бобоев Г.Ю. (TJ); Зуурбекова О.С. (TJ)

(54) **ШТАММ О №1/ТАДЖИКИСТАН/2016 ВИРУСА ЯЩУРА АРПТАЕ ЕРИЗОТИСАЕ ТИПА О ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ЯЩУРА ТИПА О**

(56) 1. Ререр Х. Ящур. Пер. с нем. Г.А.Сурковой /Под ред. и с предисл. канд. вет. наук П.В.Малянца. - М., Колос, 1971, 432 с.

2. Бурдов А.Н., Дудников А.И., Малярец П.В. и др. Ящур /Под ред. А.Н.Бурдова. - М., Агропромиздат, 1990, 320 с.

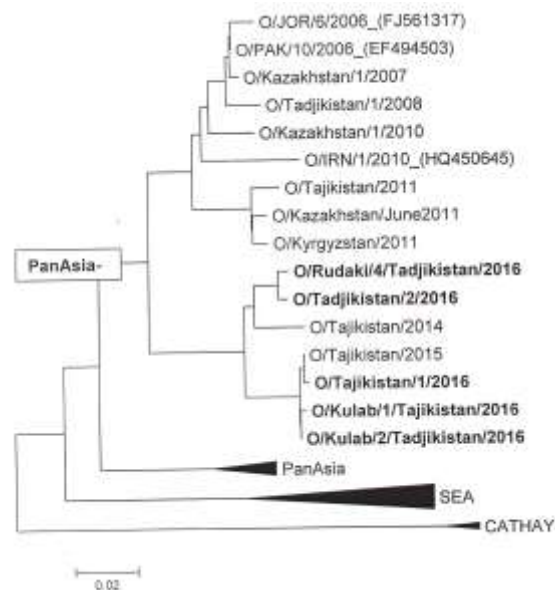
3. Сюрин В.Н. и др. Вирусные болезни животных. - М., ВНИИТИБП, 1998. - С.532-548.

4. Иммунобиологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа О №1964/Монголия/2004/ Т.А. Фомина, В.К. Спирин, А.И. Егорова [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2005. - Т. 3. - С. 94-104.

5. Иммунобиологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа О №1734 «Приморский-2000» / В.К. Спирин, А.И. Егорова, С.Р. Кременчугская [и др.] // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - Владимир, 2007. - Т. 5. - С. 52-57.

6. Пат. РФ №2204599, С12N 7/00, А61K 39/135, 20.05.2003 г.

(57) Изобретение представляет собой штамм вируса ящура *Aphtae epizooticae* типа О, сем. *Picornaviridae*, род *Aphtovirus*, депонированный в коллекцию штаммов микроорганизмов Национального центра коллекции штаммов патогенных микроорганизмов при ГУ Института проблем биологической безопасности ТАСХН под регистрационным номером вирус ящура штамм О №1 /Таджикистан/2016 (производственный), для изготовления биопрепаратов для диагностики ящура типа О, характеризующийся тем, что он получен в течение последовательного пассирования в культурах клеток гомологичного и гетерологичного происхождения, обладает высокой биологической активностью в нативном виде и сохраняет высокую антигенную активность после инактивации.



Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии, биотехнологии и может быть использовано для контроля антигенной и иммуногенной активности противоящурных вакцин, а также при разработке и изготовлении средств диагностики и профилактики ящура типа О.

Ящур - опасная острая высококонтагиозная вирусная болезнь, проявляющееся лихорадкой, везикулярными (афтозными) поражениями слизистой оболочки ротовой полости, бесшерстных участков кожи головы, вымени, венчика, межкопытной щели и сопровождающееся нарушением движения. Имеет довольно широкое распространение в ряде стран земного шара и наносит значительный экономический ущерб животноводству. Болезнь сопровождается большими потерями молока, мяса и других видов животноводческой продукции, затрудняет коммерческие операции и хозяйственную деятельность.

Вирус ящура относится к семейству Picornaviridae, роду Aphthovirus, имеет 7 серотипов: А, О, С, Азия-1, Sat-1, Sat-2, Sat-3 и множество антигенных вариантов [1,2].

Возбудитель ящура обладает значительной антигенной вариабельностью штаммов в пределах одного серотипа, которая выявляется в различных временные промежутки и на разных территориях и зависит от видового состава восприимчивого поголовья, его иммунного статуса и множества других различных факторов. Антигенная изменчивость вируса ящура обусловлена заменами аминокислот в полипептидных фрагментах, экспонированных на поверхности капсидных белков.

Сдвиги антигенного спектра, соответствующие обновлению структуры нового полевого штамма, могут варьировать от незначительных, улавливаемых моноклональными антителами, до существенных, регистрируемых с помощью традиционных поликлональных иммуноглобулинов. Существенные изменения антигенных характеристик природного штамма с большой вероятностью вызывают ослабление специфического иммунитета, индуцированного негомологичным антигеном. Они вызывают также затруднения штаммоспецифической диагностики. В результате возникает необходимость создания новых средств диагностики и специфической иммунопрофилактики [2,3].

Известен штамм типа О №1736/Абхазия/2000, выделенный от КРС в Гальском районе Абхазии, О №1964/Монголия/2004, выделенный от КРС в феврале 2004 г. в Восточно-гобийском аймаке Монголии, для изготовления диагностических и вакцинных препаратов [4].

В апреле 2000 г. на территории РФ в Приморском крае в ОПХ «Степное» с. Элитное Уссурийского района от свиней был выделен

изолят, из которого получен штамм типа О №1734 «Приморский-2000» [5,6].

Производственный штамм №1734 «Приморский-2000» использовался в Российской Федерации в качестве производственного при изготовлении средств специфической профилактики и диагностики, применяемых на всей территории России и в странах-членах СНГ.

Наиболее близким предлагаемому изобретению по совокупности существенных признаков является штамм О №2108/Забайкальский/2010 вируса ящура типа О для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа О.

Недостатки известных штаммов, в том числе и штамма-прототипа, состоят в антигенных отличиях от изолятов вируса ящура типа О, выделенных в различные временные промежутки, а приготовленные на их основе вакцины обеспечивают эффективную защиту животных только против заражения гомологичным вирусом.

Целью изобретения является – расширить арсенал производственных штаммов вируса ящура типа О, обладающих высокой инфекционной и антигенной активностью в нативном виде и сохраняющих антигенную активность после инактивации, пригодных для изготовления чувствительных и высоко-специфичных диагностических препаратов.

Указанная цель достигается получением штамма О №1/Таджикистан/2016 (авторское наименование) вируса ящура для изготовления биопрепаратов для диагностики ящура типа О.

Вирусный изолят, послуживший источником для получения штамма О/Таджикистан/2016, был выделен в марте 2016 года от больного крупного рогатого скота (КРС) в ч/х Гиссарского района.

Штамм вируса ящура типа О №1/Таджикистан/2016 получен путем последовательных пассажей на чувствительных культурах клеток.

Штамм вируса ящура типа О депонирован в 2018 году в Национальном центре коллекции штаммов патогенных микроорганизмов при ГУ Института проблем биологической безопасности ТАСХН под регистрационным номером: вирус ящура типа О №1/Таджикистан/2016.

Сущность изобретения пояснена на дендограмме, приведенная на рисунке, отражающая филогенетические взаимоотношения штамм вируса ящура типа О №1/Таджикистан/2016 с эпизоотическими и вакцинными штаммами вируса ящура серологического типа О. Дендограмма основана на сравнении полных нуклеотидных последовательностей гена VP 1.

Штамм О №1/Таджикистан/2016 вируса ящура характеризуется следующими признаками и свойствами.

Морфологические признаки

Штамм О №1/Таджикистан/2016 вируса ящура принадлежит к роду *Aphtovirus* семейству *Pisomaviridae* и представляет собой небольшую частицу, состоящую из одноцепочечной молекулы РНК. Вирионы представляют собой мелкие частицы диаметром 23-25 нм. Они состоят из внутренней части, представленной РНК и белковой оболочки, которая состоит из 32 структурных компонентов. В вирионе содержится 31,5% РНК и 68,5% белка.

Антигенные свойства

По своим антигенным свойствам штамм О №1/Таджикистан/2016 вируса ящура относится к серотипу О. Вирус стабильно нейтрализуется гомологичной антисывороткой. Вирус не проявляет гемагглютинирующей активности.

У переболевших животных в сыворотке крови образуются антитела, выявляемые в иммуноферментном анализе (ИФА) и реакции микронейтрализации (РМН). При иммунизации КРС вакциной из инаktivированного вируса индуцирует образование специфических антител, выявляемых в ИФА и РМН.

Методом нуклеотидного секвенирования была определена первичная структура гена VP1 штамма О №1/Таджикистан/2016 вируса ящура. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей которое показано на дендрограмме, свидетельствует, что штамм О №1/Таджикистан/2016 принадлежит к генетической линии вируса ящура О-ПанАзия-2, топотипа Средний Восток-Южная Азия.

При изучении в РМН антигенного соответствия штамма О/Таджикистан/2016 другим штаммам установлено, что он отличается от производственного штамма О/Приморский/2000 (показатель r_1 был менее 0,3), однако данный штамм имеет антигенное родство со штаммами О₁ Маниса и О-ПанАзия-2 (показатель r_1 был больше 0,3).

Результаты исследований в РМН представлены в таблице 1.

При значении $r_1 \geq 0,3$ полевой изолят и производственный штамм являются близкородственными, и вакцина из производственного штамма будет защищать от эпизоотического вируса, при значении $r_1 \leq 0,3$ полевой изолят отличается от производственного штамма, и вакцина из данного штамма не защищает от эпизоотического вируса.

Культуральные признаки

Данный штамм адаптируется в течение 3-х пассажей в монослойной культуре клеток почки свиньи (СП), перевиваемых культурах клеток почки сибирского горного козерога (ПСГК-30) и почки свиньи (IB-RS-2). Вирус вызывает ЦПД в течение 20-24 часов после заражения и накапливался с титром инфекционной активности от 4,85 до 5,15 lg ТЦД₅₀/см³.

Устойчивость к внешним факторам

Штамм О/Таджикистан/2016 устойчив к эфиру, хлороформу, фреону, ацетону и другим органическим растворителям и детергентам. Наиболее стабилен при pH 7,2-7,6. Сдвиги pH как в кислую, так и в щелочную сторону ведут к инаktivации вируса. Чувствителен к формальдегиду, УФ-облучению, γ -облучению, высоким температурам.

Дополнительные признаки и свойства

Реактогенность - реактогенными свойствами не обладает.

Патогенность - патогенен для парнокопытных животных, новорожденных мышат, морских свинок.

Вирулентность - вирулентен для естественно-восприимчивых животных при контактном, аэрозольном и парентеральном заражении.

Стабильность - сохраняет исходные биологические свойства при пассировании в чувствительных биологических системах в течение 3 пассажей.

Сущность предлагаемого изобретения пояснена примерами его использования, которые не ограничивают объем изобретения.

Пример 1

Вирусный изолят, послуживший источником для получения штамма О/Таджикистан/2016, был выделен в Институт проблем биологической безопасности ТАСХН и в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб афтозного материала, полученных в марте 2016 года от подозреваемой в заболевании ящуром крупного рогатого скота из ч/х Гиссарского района.

При выделении вируса с целью получения его однородной популяции, обладающей оптимальными биотехнологическими свойствами, использовали комплекс биологических, вирусологических и биохимических методов, предусмотренных методическими указаниями по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура. Биологические и вирусологические методы включали в себя выделение вируса и его адаптацию.

Выделение вируса на культуре первично трипсинизированных клеток СП, перевиваемых линиях клеток ПСГК-30, IB-RS-2, с последующей адаптацией (3 пассажа). Для постановки биопроб на первичных и перевиваемых культурах клеток их выращивали на соответствующих питательных средах, в стационарных условиях во флаконах с площадью поверхности 25 см², отмывали от ростовой среды и заражали 10% суспензией афтозного материала (множественность заражения составляла 1-10 ТЦД₅₀ на клетку), приготовленной в растворе Хенкса с 0,5% гидролизата лактальбумина (ГЛА) и антибиотиками по стандартной рецептуре. Для удаления микрофлоры и балластных клеточных компонентов суспензию обрабатывали 10% хлороформа. После 30-минутного контакта при 37°C во флаконы вносили по 5см³ поддерживающей среды и инкубировали при

37°C до появления ЦПД вируса. При наличии ЦПД (округление клеток, повышение их оптической плотности, дегенерация и отделение клеток от стекла) флаконы подвергали замораживанию-оттаиванию, очистке клеточной взвеси хлороформом и центрифугированию при 3000g в течение 15 минут.

Результаты адаптации вируса к различным клеточным культурам представлены в таблице 2.

Данные, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о высокой адаптационной способности штамма О №1/Таджикистан/2016 вируса ящура типа О к использованным клеточным культурам.

Изолированный с помощью перечисленных методов вирусный препарат был исследован в реакциях: РСК (1:8), ИФА (1:16) с целью идентификации его типовой принадлежности (таблица 3).

Пример 2

Штамм О №1/Таджикистан/2016 вируса ящура *Aphtae epizooticae* типа О, предназначенный для контроля иммуногенной активности противоящурных вакцин на КРС, готовят следующим образом. Полученный вирус предварительно освежают на КРС, заражая 1-2 животных массой 250-300 кг, доставленных из благополучных по ящуру зон страны, где в течение последних 2-х лет не проводили

вакцинацию животных против ящура. Количество пассажей вируса не должно превышать 20, начиная от исходного вируса. Суспензию вируса, содержащую 10000-10000000 ИД₅₀/1 см³ с антибиотиками, вводят по 0,2-0,3 см³ в 20-40 каналов интрадермально по всей поверхности языка. Зараженных животных не кормят до снятия вируса. Через 20-30 часов после заражения афты снимают по мере их созревания. Лимфу собирают шприцем. На основе собранного афтозного материала готовят 20%-ную суспензию вируса, которую очищают от балластных примесей с последующим добавлением в нее антибиотиков и равного объема глицерина. Полученную 10% суспензию вируса оценивают в РСК на типоспецифичность и методом ОТ-ПЦР с последующим проведением нуклеотидного секвенирования на соответствие исходному вирусу по первичной структуре гена VP1.

Активность вируса в РСК должна быть не ниже 1:4.

Инфекционную активность вируса определяют на КРС и в первичной культуре клеток СП. Контрольный вирус должен иметь титр инфекционной активности не менее 10^{4,0} ИД₅₀/0,1 см³. Флаконы с суспензией вируса в присутствии глицерина хранят в холодильнике при температуре минус (70°C-40°C).

Таблица 1

Результаты определения антигенного соответствия (г₁) штамма вируса ящура типа О/Таджикистан/2016 производственными штаммами типа О в РМН

Штамм	Показатель, г ₁		
	О ₁ Маниса	О/Приморский/2000	О-ПанАзия-2
№1/Таджикистан/2016	0,77	0,21	0,76

Таблица 2

Адаптация штамм О/Таджикистан/2016 вируса ящура к различным клеточным культурам

Система репродукции вируса ящура					
СП		ПСГК-30		IB-RS-2	
ЦПД час	Титр lg ЦПД ₅₀ /мл	ЦПД час	Титр lg ЦПД ₅₀ /мл	ЦПД час	Титр lg ЦПД ₅₀ /мл
21	4,85	20	5,15	24	5,15

Таблица 3

Типовой принадлежности штамма типа О №1/Таджикистан/2016 в РСК и ИФА

Антиген	РСК			ИФА		
	A ₂₂	O ₁	Азия-1	A ₂₂	O ₁	Азия-1
№1/Таджикистан/2016	-	1:8	-	-	1:16	-
Положительный контроль	1:64	1:64	1:64	1:128	1:128	1:256
Отрицательный контроль	-	-	-	-	-	-

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм вируса ящура *Aphtae epizooticae* типа О, сем. *Picornaviridae*, род *Aphtovirus*, депонированный в коллекцию штаммов микроорганизмов Национального центра коллекции штаммов патогенных микроорганизмов при ГУ Института проблем биологической безопасности ТАСХН под регистрационным номером вирус ящура штамм О №1 /Таджикистан/2016 (производственный), для изготовления биопрепаратов для диагностики ящура типа О, характеризующийся тем, что он получен в течение последовательного пассирования в культурах клеток гомологичного и гетерологичного происхождения, обладает высокой биологической активностью в нативном виде и сохраняет высокую антигенную активность после инактивации.

2. Штамм по п. 1, характеризующийся тем, что он получен в течение 3

последовательных пассажей в культуре клеток свиной почки (СП) с титром инфекционной активности $4,85 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и антигенной активностью в реакции связывания комплемента (РСК) 1:8.

3. Штамм по п. 1, характеризующийся тем, что он получен в течение 3 последовательных пассажей в культуре клеток почки сибирского горного козерога (ПСГК-30) с титром инфекционной активности $5,15 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и антигенной активностью в реакции связывания комплемента (РСК) 1:8.

4. Штамм по п. 1, характеризующийся тем, что он получен в течение 3 последовательных пассажей в культуре клеток почки свиньи (IB-RS-2) с титром инфекционной активности $5,15 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и антигенной активностью в реакции связывания комплемента (РСК) 1:8.

Компьютерный набор: Ризоева С.

Заказ

Тираж

Подписное

Национальный патентно-информационный центр РТ734042, г. Душанбе,
ул. Айни, 14а