

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036087**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.24**

**(51)** Int. Cl. **C12N 7/00** (2006.01)  
**A01N 63/00** (2006.01)  
**A01N 25/00** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201800510**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.08.22**

---

**(54) ШТАММ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА  
LYMANTRIA DISPAR L., ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНСЕКТИЦИДНОГО  
ПРЕПАРАТА**

---

**(31)** 2017143083

**(56)** RU-A-96115819  
EA-A-199800542  
EA-A-200600937  
US-A-5882913  
US-A-5420031

**(32)** 2017.12.08

**(33)** RU

**(43)** 2019.06.28

**(96)** 2018000106 (RU) 2018.08.22

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
"ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ  
ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ "ВЕКТОР"  
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО  
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И  
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
(ФБУН ГНЦ ВБ "ВЕКТОР"  
РОСПОТРЕБНАДЗОРА) (RU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Колосов Алексей Владимирович,  
Моисеева Анастасия Алексеевна,  
Охлопкова Олеся Викторовна,  
Сафатов Александр Сергеевич (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии, а именно к производству биологических инсектицидов для лесного и сельского хозяйства на основе нового штамма вируса ядерного полиэдрома (ВЯП), патогенного для личинок непарного шелкопряда (НШ), являющихся опасным вредителем лиственных лесов. Техническим результатом предлагаемого изобретения является создание такого нового штамма ВЯП *Lymantria dispar* L. для производства инсектицидного препарата, который обладал бы большей вирулентностью по отношению к непарному шелкопряду по сравнению с известными аналогами и прототипом. Указанный технический результат достигается созданием штамма вируса ядерного полиэдрома непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. НШ-07, используемого для получения инсектицидного препарата и депонированного в государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора под номером V-799.

---

**B1**

**036087**

**036087**

**B1**

Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии, а именно к производству биологических инсектицидов для лесного и сельского хозяйства на основе нового штамма вируса ядерного полиэдро́за (ВЯП), патогенного для личинок непарного шелкопряда (НШ), являющихся опасным вредителем лиственных лесов.

Вирус ядерного полиэдро́за непарного шелкопряда (*Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus*) относится к семейству бакуловирусов (*Baculoviridae*).

ВЯП НШ может быть использован как активная основа энтомопатогенного препарата для подавления вспышек массового размножения непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. (синоним *Porthetria dispar*, [http://www.sevin.ru/invasive/invasion/insects/settled/lymantria\\_dispar.html](http://www.sevin.ru/invasive/invasion/insects/settled/lymantria_dispar.html)). Применение подобного препарата является экономически и экологически оправдано, поскольку, во-первых, стоимость препарата, созданного на основе ВЯП НШ, в пересчете на обрабатываемую площадь оказывается ниже, чем стоимость используемых в настоящее время химических пестицидов; во-вторых, вызывая заболевание и гибель только личинок непарного шелкопряда, он не оказывает вредного воздействия на другие виды животных (насекомых и позвоночных).

Известен штамм S-13-р ВЯП *Lymantria dispar* L. (он же *Porthetria dispar*), используемый для производства вирусного инсектицидного препарата против непарного шелкопряда Вирин-ЭНШ и полученный путем адаптации ВЯП ивовой волянки к НШ (Итоги и перспективы производства и применения вирусных препаратов в сельском и лесном хозяйстве. Сб. , М., 1984, с.3-14). Биологическая активность препарата, полученного на основе штамма S-13-р, для гусениц *Porthetria dispar* имеет ЛК<sub>50</sub> 4×10<sup>5</sup> полиэдров на гусеницу.

Недостатком штамма S-13-р ВЯП является низкая вирулентность по отношению к гусеницам непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. (он же *Porthetria dispar*).

Известен штамм ВЯП *Lymantria dispar* L. (он же *Porthetria dispar* (Pd-1-5)) ВКПМ virus-1, используемый для производства инсектицидного препарата против непарного шелкопряда (Авторское свидетельство СССР № 1638161, МПК C12N 7/00, опубл. 30.03.91). Биологическая активность препарата, полученного на основе штамма Pd-1-5, для гусениц *Lymantria dispar* L. имеет ЛК<sub>50</sub> 0,2·10<sup>5</sup> полиэдров на гусеницу.

Недостатком штамма Pd-1-5 является низкая вирулентность по отношению к гусеницам непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L.

Наиболее близким аналогом (прототипом) является штамм ВЯП НШ-2-85 (авторское название) *Lymantria dispar* L. для производства инсектицидного препарата, который обладает большей вирулентностью по отношению к непарному шелкопряду по сравнению с выше приведенными аналогами (патент РФ № 2117701, МПК C12N 7/00, опубл. 20.08.1998 г.). Штамм ВЯП НШ-2-85 депонирован в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под номером ГКВ № 2156. Родословная штамма: штамм НШ-2-85 (ГКВ № 2156) получен путем перемежающихся пассажей на гусеницах непарного шелкопряда различных популяций (оренбургской, московской, тюменской) вируса ядерного полиэдро́за непарного шелкопряда, выделенного из павших в инсектарии ГНЦ ВБ "Вектор" гусениц непарного шелкопряда вследствие спонтанного полиэдро́за в 1985 году.

Однако и такой штамм ВЯП НШ-2-85 обладает недостаточной вирулентностью по отношению к гусеницам непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является создание такого нового штамма ВЯП *Lymantria dispar* L. для производства инсектицидного препарата, который обладал бы большей вирулентностью по отношению к непарному шелкопряду по сравнению с известными аналогами и прототипом.

Указанный технический результат достигается созданием штамма вируса ядерного полиэдро́за непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. НШ-07, используемого для получения инсектицидного препарата и депонированного в государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора под номером V-799.

Штамм ВЯП НШ-07 выделен в августе 2015 г. из личинки непарного шелкопряда (гомогената гусеницы) лабораторной популяции, погибшей от активации латентной инфекции (Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Кольцово), с использованием метода слепого пятикратного пассирования образца на личинках (*Lymantria dispar* L.) путем заражения *per os* и приготовления гомогената из погибших личинок после каждого пассажа.

Идентификация штамма ВЯП НШ-07 проведена во ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора. Полногеномное секвенирование проведено с помощью технологии MiSEQ (Illumina). Среднее покрытие составило 49.7. Сборка генома проводилась картированием на референс-последовательность с помощью алгоритма BWA (v. 0.7.15). Работа выполнена Шваловым А.Н. в лаборатории вирусологии флавивирусов отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов.

Пассирование заявляемого штамма вируса ядерного полиэдро́за НШ-07 с использованием метода массового отбора.

На первом этапе в течение 5 пассажей при индивидуальном заражении личинок 4-го возраста дозой

$1 \times 10^5$  пз/гус. отбирали гусениц, погибших в течение 9 суток от момента заражения, и выделяли из них вирус, который использовали для следующего пассажа.

На втором этапе снижали дозу заражения личинок непарного шелкопряда 4-го возраста до  $1 \times 10^4$  и на протяжении 4 пассажей отбирали гусениц по тому же принципу.

На третьем этапе инфицировали личинок 5 возраста дозой  $1 \times 10^4$  и для каждого следующего инфицирования отбирались гусеницы, погибшие от полиэдроза на 7-10 сутки после заражения при предыдущем инфицировании. В результате использования метода массового отбора активность заявляемого штамма стала на 60 % выше, чем у наиболее активного аналога (штамма НШ-2-85).

Число пассажей к моменту паспортизации и депонирования: штамм прошел 11 пассажей на гусеницах непарного шелкопряда при заражении перорально.

Характеристика штамма.

Культурально-морфологические особенности штамма.

Размеры полиэдров (мкм):  $\varnothing$  5-10, размеры вирионов (нм):  $400 \times 80$ , нуклеокапсидов  $310 \times 50$  нм. Штамм обладает высокой репродуктивной активностью, хорошо хранится при  $4^\circ\text{C}$ . Оптимальные культуры насекомых для культивирования *Lymantria dispar* L.

Способ, условия и состав сред для размножения.

Штамм бакуловируса НШ-07 размножают путем инфицирования личинок непарного шелкопряда и дальнейшего содержания их при температуре  $25^\circ\text{C}$  и влажности 60% на искусственной питательной среде (ИПС) в течение 18 суток. Состав ИПС: соевая мука - 15 г, кукурузная мука - 75 г, дрожжи кормовые - 30 г, аскорбиновая кислота - 4,5 г, бензойная кислота - 5,0 мл, агар - 6 г, вода дистиллированная - 351 мл.

Активность (продуктивность) штамма.

Выход вируса составляет  $5 \times 10^8$  полиэдров на гусеницу при его культивировании на личинках *Lymantria dispar* L. 4-го возраста.

Биохимическая активность.

Чувствителен к эфиру, формалину, хлорамину, хлороформу; нечувствителен к ацетону.

Серологические свойства.

Белковый состав вируса: состоит из 34 полипептидов. Молекулярный вес основных полипептидов: от 18 до 75 МД.

Генетические характеристики штамма.

ДНК кольцевая ковалентнозамкнутая. Длина генома 158,9 т.п.н. Доля GC - 57,46%. Установлены сайты рестрикции (количество) для HindIII - 20, EcoRI - 20, PstI - 75, BamHI - 14. Ближайшая опубликованная полная последовательность - KM386655.1 (*Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus strain 3029, complete genome) - 1574 замены.

Вирулентность (патогенность).

Для человека не патогенен.

Патогенность для животных. Высокопатогенен исключительно для личинок непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. и абсолютно безопасен для других видов животных, включая класс насекомые.

Для растений не патогенен.

Антигенные свойства штамма.

Преципитирующая активность антисыворотки с гомологичным вирусом методом двойной иммунодиффузии составляет 1/32.

Способ хранения.

Штамм хранится при  $-30^\circ\text{C}$  в виде очищенных и лиофильно высушенных при  $-20^\circ\text{C}$  полиэдров.

Штамм вируса также хранят в погибших гусеницах, помещенных в 50%-ный водный раствор глицерина при  $T=4^\circ\text{C}$ .

Проверка жизнеспособности культуры.

Биологическая активность штамма ВЯЛ НШ-07 составляет  $Ig$  ЛД<sub>50</sub>= $2.40 \pm 0.22$  (на гусеницах 3-го возраста непарного шелкопряда лабораторной популяции), ЛВ<sub>50</sub>=7.5 суток при заражении дозой ЛД<sub>90</sub>. Выход вируса при заражении гусениц 4-го возраста  $2-6 \times 10^8$  полиэдров на гусеницу.

Пересев вируса осуществляют путем инфицирования личинок непарного шелкопряда и дальнейшего содержания их при температуре  $25^\circ\text{C}$  и влажности 60% на искусственной питательной среде (ИПС). Состав ИПС: соевая мука - 15 г, кукурузная мука - 75 г, дрожжи кормовые - 30 г, аскорбиновая кислота - 4,5 г, бензойная кислота - 5,0 мл, агар - 6 г, вода дистиллированная - 351 мл.

Пример 1. Технология получения вирусного инсектицидного препарата.

Технология производства вирусных препаратов осуществляется по следующей схеме: выращивание насекомых, культивирование в них вирусов, сбор погибших гусениц, выделение вирусной биомассы и получение готового продукта.

Партию гусениц непарного шелкопряда по достижению ими четвертой возрастной стадии инфицируют вирусом ядерного полиэдроза (штамм НШ-07). Для этого искусственную питательную среду (корм) опрыскивают вирусной суспензией штамма НШ-07 (рег. № V-799) с титром  $1-2 \times 10^7$  полиэдров/мл и

скармливают зараженный корм гусеницам НШ. Гусениц НШ содержат при  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  и влажности 65%. Время инкубирования инфицированных гусениц 11-12 дней. При этом гибель насекомых составляет не менее 75%. Затем личинки собирают и замораживают при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 18 ч, лиофилизируют и переносят в аппарат для удаления волосков, являющихся сильным аллергеном. Аппарат представляет собой специальный барабан для стряхивания волосков, которые затем удаляют посредством вакуумной системы. Лишенные волосков лиофилизованные гусеницы размалывают для получения сухого вирусного порошка. В качестве наполнителя используют цеолит или кремниевую кислоту. Препарат в сухой форме представляет собой порошок белого цвета с титром не менее  $(2-5) \times 10^9$  полиэдров/г. Для получения жидкой формы препарата (в виде суспензии) перед применением сухой препарат растворяют в воде до нужной концентрации с добавлением поверхностно-активного вещества (ПАВ), например ОП-7. Титр жидкой формы препарата составляет не менее  $1 \times 10^9$  полиэдров/мл. Расход препарата при наземно-очаговой обработке составляет  $1,1 \pm 0,3$  мл/га.

Пример 2. Исследование токсичности и патогенности вирусного препарата на основе штамма НШ-07 (рег. № V-799).

Проведена инфекционно-токсикологическая оценка препарата на основе штамма НШ-07 (рег. № V-799). Испытания безопасности для теплокровных выполнены в соответствии с "Методическими указаниями по оценке новых пестицидов. МЗ СССР, 1988 г." и рекомендациями ВОЗ/ФАО, Женева 1975 г. по испытанию безопасности бакуловирусов.

Проведены эксперименты по выявлению токсичности-патогенности препарата на мышах. 5 группам мышей по 10 в каждой вводили суспензию препарата в желудок и в брюшину из расчета по 1 мг препарата на 1 г веса, а в контрольной группе - внутрибрюшинно (физраствор).

Введение дозы 1000 мг на 1 кг веса не приводит к гибели животных при введении в желудок. Внутрибрюшинное введение вызывало гибель отдельных животных. При вскрытии обнаружены кремнийсодержащие конгломераты в месте введения и частично в брюшной полости. Гибель животных вызвана токсичным действием наполнителей. При внутрибрюшинном введении  $LD_{50}$  находится за пределами 1500 мг/кг, что по гигиенической классификации токсичности пестицидов расценивается, как малотоксичное вещество (4 группа).

Кожно-резорбтивное действие изучалось на морских свинках при разовом и многократном воздействии препарата на основе штамма НШ-2-85, а также его действующего начала на неповрежденную и скарифицированную кожу. Однократное или многократное нанесение препарата на поврежденную кожу каких-либо заметных реакций на месте введения или в организме животных не вызывало. На скарифицированной коже однократное нанесение реакций не вызывало, а в процессе многократного воздействия отмечалось местное раздражение, которое исчезало через 2-3 дня после окончания воздействия.

Изучение раздражающего действия препарата на слизистую глаз кроликов показало, что однократное воздействие не вызывает раздражение слизистых, а многократное приводило к развитию конъюнктивитов. Выздоровление наступало через 5-7 дней после последнего воздействия.

Инфекционная оценка препарата проведена на теплокровных. Для осуществления экспериментов предварительно изготавливают специфические ингредиенты: гипериммунные кроличьи сыворотки против ВЯП НШ, выделяют IgG на их основе, разрабатывают и получают эритроцитарные диагностикумы для использования в иммунологических реакциях РПГА и РОПГА.

Эксперименты проводили на белых мышах 18-20 г, которым вводили суспензию полиэдров ВЯП НШ в желудок, внутрибрюшинно и интраназально по  $0,2$ ,  $0,5$  и  $0,4 \times 10^9$  полиэдров/мл соответственно. Контрольной группе вводили по  $0,5$  мл физраствора в брюшину. Животных термометрировали, и в динамике исследовали сыворотку крови на наличие антител и антигена во внутренних органах животных.

Во всех случаях визуальные наблюдения и термометрия не выявили отклонений от физиологической нормы. С помощью РПГА в сыворотках крови выявляли антитела в невысоких титрах на 5, 7-9 дни при всех способах введения. У животных с помощью РОПГА выявляли специфический бакуловирусный антиген в постепенно убывающих количествах до 7 суток. Такая динамика подтверждает активную элиминацию антигена из организма и отсутствие репродуктивного процесса.

Таким образом, результаты исследования токсичности-патогенности вирусного препарата на основе штамма НШ-2-85 (ГКВ N 2156) показали, что препарат можно отнести к малотоксичным веществам по гигиенической классификации ( $LD_{50}$  более 1000 мг/кг). Действующее начало препарата ВЯП НШ-07 не токсично для теплокровных, не репродуцируется в теплокровном организме, не вызывает инфекционного процесса.

Пример 3. Испытание опытного образца вирусного препарата на основе штамма НШ-07 (рег. № V-799).

Испытания проведены на участках лесного фонда Шебалинского лесничества Республики Алтай против личинок (2-3 возрастов) непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.). Препарат использовался с титром  $1 \times 10^8$  полиэдров/мл в виде 3,2%-ного раствора в 32%-ном водном растворе глицерина. Всего была обработана территория площадью 20 га. Расход препарата составил  $0,1$  л/га. Общий расход препарата составил 2 л. Обработка проводилась при помощи аэрозольной установки ГАРД на базе автомобиля

Урал-4320.

Эффективность действия препарата определяли по степени дефолиации обработанных участков в сравнении с контрольными (не обработанными) участками и по наличию непарного шелкопряда.

Результаты обследования показали, что на опытных участках непарный шелкопряд отсутствовал и признаков дефолиации обнаружено не было. На контрольных участках на деревьях присутствовали куколки и гусеницы непарного шелкопряда 5-6 возрастов, дефолиация составляла  $60 \pm 10\%$ .

Использование опытного образца вирусного препарата на основе штамма НШ-07 против гусениц непарного шелкопряда, достигших 2-3 возрастов, позволяет эффективно контролировать численность этого вредителя леса и не допускать дефолиации деревьев.

Препарат удобен для применения в полевых условиях с использованием аэрозольных опрыскивателей, является экологически чистым и обладает избирательным действием к целевому насекомому - непарному шелкопряду (*Lymantria dispar* L.).

Пример 4. Сравнительные данные биологической активности заявляемого штамма НШ-7-12 и штаммов-аналогов.

Для получения сравнительных данных параллельно из разных партий гусениц, инфицированных разными штаммами вирусов, получают вирусный материал на основе известных штаммов S-13-p, Pd-1-5 и НШ-2-85 и заявляемого штамма НШ-7-12.

Биологическую активность штаммов вирусов оценивают путем определения величины ЛД<sub>50</sub> - дозы вируса (полиэдров на гусеницу), вызывающей гибель 50% инфицированных насекомых, и ЛВ<sub>50</sub> - время (в сутках), за которое погибает 50% гусениц, инфицированных дозой  $10^7$  полиэдров/гусеницу (пэ/гус). Расчет проводят по методу Кербера, гибель насекомых определяют с поправкой по формуле Аббота (Ашмарин И.П., Воробьев А.А.//Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962, с.350). Данные приведены в таблице (ЛВ<sub>50</sub> по каждому штамму находится в интервале 7-8 суток).

Данные биологической активности штаммов вирусов ВЯП НШ

Наименование штамма	Биологическая активность, Lg(ЛД <sub>50</sub> ) $\pm 1.96\sigma$
НШ-07 (заявляемый)	2,4 $\pm$ 0,2
НШ-2-85 (прототип)	2,6 $\pm$ 0,2
Pd-1-5 (аналог 2)	4,3 $\pm$ 0,3
S-13-p (аналог 1)	5,6 $\pm$ 0,4

Анализ таблицы показывает, что заявляемый штамм НШ-7-12 позволяет получить вирусный инсектицидный препарат, который патогенен для гусениц НШ *Lymantria dispar* L. По своей активности он в 1,6 раза превосходит инсектицид на основе известного наиболее близкого аналога штамма НШ-2-85 (прототипа) и на порядок превышает инсектициды, полученные на основе штаммов-аналогов S-13-p и Pd-1-5.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. НШ-07, используемый для получения инсектицидного препарата и депонированный в государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора под номером V-799.

