

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЙ
ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

Капустина Ольга Владимировна

**РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ И МЕТОДОВ
КОНТРОЛЯ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ
ВИРУСАМИ ПОРЯДКА *MONONEGAVIRALES***

**06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук

Научный консультант
доктор биологических наук,
профессор Власов Н.А.

Вольгинский – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
1. ВВЕДЕНИЕ	8
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
2.1 Эпизоотическая обстановка по особо опасным зооантропонозным болезням, вызываемых представителями порядка <i>Mononegavirales</i>	19
2.2 Характеристика вирусов - отдельных представителей семейств <i>Orthomixoviridae</i> , <i>Paramixoviridae</i> и <i>Bunjaviridae</i> порядка <i>Mononegavirales</i>	20
2.2.1 Характеристика вируса гриппа А	23
2.2.2 Характеристика вируса болезни Ньюкасла	26
2.2.3 Характеристика вируса лихорадки долины Рифт	28
2.2.4 Реассортация РНК содержащих вирусов, имеющих сегментированный геном	38
2.3 Диагностика особо опасных инфекций	40
2.3.1 Диагностика гриппа птиц, болезни Ньюкасла	41
2.3.2 Диагностика лихорадки долины Рифт	41
2.4 Использование рекомбинантных белков в качестве специфических антигенов	44
2.5 Гибридная технология и применение моноклональных антител	45
2.6 Противовирусный и поствакцинальный иммунитет	49
2.6.1 Особенности иммунного ответа при ДНК-иммунизации	52
2.7 Методы повышения иммуногенности вакцинных препаратов	55
2.8 История создания средств специфической профилактики лихорадки долины Рифт	57
2.9 Стратегия контроля лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла	63
2.10 Заключение к обзору литературы	66
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	68
3.1 Материалы и методы	68
3.1.1 Материалы	68
3.1.1.1 Вирусы, антигены, сыворотки	68
3.1.1.2 Животные	69
3.1.1.3 Культуры клеток	69

3. 1.1.4 Гибридомы	69
3.1.1.5 Рекомбинантные плазмиды и рекомбинантные белки	70
3. 1.1.6 Питательные среды, добавки к ним, ферменты, соли	70
3. 1.1.7 Оборудование	71
3. 1.2 Методы	71
3.1.2.1 Получение культурального вируссодержащего материала	71
3.1.2.2 Определение концентрации белка	72
3.1.2.3 Иммунизация мышей	72
3.1.2.4. Базовый протокол получения моноклональных антител	72
3.1.2.5 Скрининг гибридных антителопродуцентов	72
3.1.2.6 Изучение иммунохимических свойств МКА	74
3.1.2.7 Микровариант реакции нетрализации	76
3.1.2.8 Конъюгирование МКА с пероксидазой хрена	76
3.1.2.9 Сэндвич-вариант ТФ ИФА для выявления антигенов	76
3.1.2.10 Определение функциональных свойств ТФ ИФА	77
3.1.2.11 Определение иммунного статуса и цитокинового профиля	77
3.1.2.12 Нуклеотидное секвенирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей	78
3.2.13 Методы математического анализа	78
4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	79
4.1 Совершенствование технологии получения антител узкой направленности на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных белков	79
4.1.1 Изучение антигенных свойств рекомбинантных плазмид и рекомбинантных белков	79
4.1.2 Получение и характеристика моноспецифических сывороток на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных белков	81
4.1.3 Совершенствование технологии получения моноклональных антител и их характеристика	88
4.2 Разработка методов ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезнь Ньюкасла	104
4.2.1 Методы молекулярной диагностики для выявления генома вирусов ЛДР и гриппа птиц H5N1	104
4.2.2 Использование МКА и рекомбинантных белков для	108

индикации и идентификации антигенов вирусов лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла	
4.2.2.1 Разработка метода иммуноцитохимического анализа для обнаружения возбудителей лихорадки долины Рифт, гриппа и птиц, болезни Ньюкасла	109
4.2.2.2 Разработка тест-системы на основе моноклональных антител для идентификации и дифференциации гриппа птиц и болезни Ньюкасла	118
4.2.2.2.1 Разработка двухсайтового ТФ ИФА на основе моноклональных антител для идентификации вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла	118
4.2.2.2.2. Изучение активности и специфичности «Набора препаратов на основе моноклональных антител к нуклеопротеину для идентификации и дифференциации гриппа птиц и болезни Ньюкасла»	128
4.2.2.3. Выявление пероксидазы хрена в качестве активной метки методом иммунохемилюминесцентного анализа	132
4.2.3 Разработка средств серологического мониторинга гриппа птиц, болезни Ньюкасла и лихорадки долины Рифт	135
4.2.3.1 Разработка непрямого ТФ ИФА для выявления специфических антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла	135
4.2.3.2 Сравнительное изучение чувствительности и специфичности методов ТФ ИФА для выявления антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла	143
4.2.3.3 Разработка непрямого ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков для выявления специфических антител к вирусу ЛДР	150
4.3 Современные подходы создания эффективных безопасных вакцин и стратегии вакцинации против особо опасных инфекций (на примере гриппа птиц подтипа H5 и лихорадки долины Рифт)	157
4.3.1 Обоснование выбора штамма вируса лихорадки долины Рифт	157
4.3.1.1 Иммунобиологические свойства штаммов вируса лихорадки долины Рифт	157
4.3.1.2 Культуральные свойства вируса лихорадки долины Рифт	159
4.3.1.3 Молекулярная характеристика штамма «1974-ВНИИВВиМ»	166
4.3.1.4 Устойчивость вируса лихорадки долины Рифт штамм	172

«1974-ВНИИВВиМ» к действию инактивантов	
4.3.1.5 Разработка лабораторных методов контроля вирусного сырья и инаktivированного антигена вируса лихорадки долины Рифт	176
4.3.1.5.1 Подбор лабораторной модели для контроля безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инаktivированного антигена вируса лихорадки долины Рифт	176
4.3.1.5.2 Разработка тест-систем для контроля накопления протективных антигенов вируса лихорадки долины Рифт	179
4.3.2 Разработка оптимальных стратегий вакцинации против гриппа птиц пятого подтипа и лихорадки долины Рифт	187
4.3.2.1 Эффективность гомологичной прайм-бустерной иммунизации на основе инаktivированного антигена вируса ЛДР	187
4.3.2.2. Эффективность гомологичной прайм-бустерной ДНК-иммунизации против гриппа птиц пятого подтипа	191
4.3.2.3. Эффективность гомологичной прайм-бустерной ДНК-иммунизации против лихорадки долины Рифт	197
4.3.2.4. Эффективность воздействия различных систем доставки иммуногена на развитие иммунного ответа против лихорадки долины Рифт	205
4.4. Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) лихорадки долины Рифт	213
5. ОБСУЖДЕНИЕ	217
6. ВЫВОДЫ	234
7. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	237
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	239
9. ПРИЛОЖЕНИЯ	282

Список сокращений

Анти-ГА	Антигемагглютинирующие антитела, выявляемые в РЗГА (РЗНГА)
СрGODN (ОДН)	цитозин-фосфат-гуанозин олигодезоксинуклеотид (СрG-ODN)
DIVA	Дифференциация инфицированных и вакцинированных животных
DNA(ДНК)	Дезоксирибонуклеиновая кислота
НАТ	Гипоксантин/аминоптерин/тимидин
НТ	Гипоксантин/тимидин
Gn и Gc	Гликопротеины вируса ЛДР
IgG	Иммуноглобулины класса G
IgM	Иммуноглобулины класса M
IgMKA	Выделенные иммуноглобулины MKA
MLD	Мышиная летальная доза
NC	Нуклеокапсид вируса ЛДР
NK	Естественные киллеры (Т-клетки)
NP	Нуклеопротеин
NSs	Неструктурный белок вируса ЛДР S- сегмента
NS1	Неструктурный белок вируса гриппа птиц
ВОЗ (WHO)	Всемирная организация здравоохранения
Th0, Th1, Th2	Типы Т-клеток хелперов
TLR-	Толл-подобные рецепторы
A-24	Теотропин, 1,8,3,6-диэндометилен-1,3,6,8-тетразациклодекан-теотропина, (А-24)
АГ	Антиген
АЧС	Африканская чума свиней
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ВБН (НБ)	Вирус болезни Ньюкасла
ВГП (ВППП)	Вирус гриппа птиц (высокопатогенный грипп птиц)
ГГФРТ	гипоксанти-гуанин-фосфорибозилтрансфераза
ГОА	Гидроокись алюминия
ДАС ТФ ИФА	Двойной антительный вариант твердофазного иммуноферментного анализа
ИББ	Инфекционная бурсальная болезнь
ИЛ-	Интерлейкин
ИФА	Иммуноферментный анализ
ИХА	Иммунохемилюминисцентный анализ

ИЦХ ИФА	иммуноцитохимический метод ИФА
КББ	Карбонатно-бикарбонатный буфер
ЛД	Летальная доза
ЛДР	Лихорадка долины Рифт
мг	Миллиграмм
МКА	Моноклональные антитела
мкг	микрограмм
МЛД	Мышиная летальная доза
МФА	Метод флюоресцирующих антител
МЭБ (OIE)	Международное эпизоотическое бюро
НТД	Нормативно-техническая документация
о.е.	Оптические единицы
ОТ-ПЦР	Обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция
ПДРФ	Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
п.о.	Пары оснований
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПА	Паскаль — единица измерения давления в Международной системе единиц (СИ)
ПСГК	Почка сибирского горного козерога
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
РАЛ	Реакция латексагглютинации
РГА	Реакция гемагглютинации
РДП	Реакция диффузной преципитации
рекДНК	Рекомбинантная ДНК
РЗГА (РТГА)	Реакция задержки (торможения) гемагглютинации
РН	Реакция нейтрализации
РНГА	Реакция непрямой гемагглютинации
РНК(RNA)	Рибонуклеиновая кислота
РНП (RNP)	Рибонуклеопротеиновый комплекс
РСК	Реакция связывания комплемента
РТНГА	Реакция торможения непрямой гемагглютинации
САА	Сахарозо-ацетоновый антиген
Трис-	Трис (гидроксиметил) аминметан
ТФ ИФА	Твердофазный иммуноферментный анализ
ТЦД	Тканевая цитопатическая доза
ФБР	Фосфатно-буферный раствор
ЦПД	Цитопатическое действие
ЭДТА	Этилендиамин тетраацетат

1 Введение

1.1. Актуальность темы

Серьезную угрозу национальной безопасности, в том числе для Российской Федерации, представляет, наблюдаемая в мире последние десятилетия, устойчивая тенденция роста и распространения особо опасных инфекций животных и человека, [33; 483; 488; 490.]. Усилившиеся миграционные потоки из стран Африки и Азии могут привести к завозу на территорию РФ, так называемых экзотических болезней.

Пристальное внимание ветеринарной службы и здравоохранения приковано к особо опасным, в том числе зооантропонозным болезням [46; 125; 182; 198; 209; 217; 243; 263; 273; 358; 376; 391; 503; 526; 545; 549; 560; 613; 623], вызванных возбудителями, относящимися к порядку *Mononegavirales*, геном которых представлен отрицательной одноцепочечной РНК [101; 166; 295; 550]. Большинство из них, в том числе лихорадка долины Рифт, высокопатогенный грипп птиц и болезнь Ньюкасла входят в список трансграничных особо опасных болезней [31; 184; 397; 578; 619], потенциальных агентов биологического оружия [45-48; 64; 70; 84; 156; 180; 380]. Именно эти инфекционные болезни рассматриваются в данной работе в связи со сложившейся эпизоотической обстановкой по гриппу птиц [15; 50; 254; 549; 558], болезни Ньюкасла [17; 22; 68; 79; 207; 255; 256; 277; 278; 310; 368; 456; 503; 510; 585] и ЛДР [14; 57; 182; 208; 574-577]. Угроза тяжелых последствий появления и распространения трансграничных болезней особо остро стоит ввиду отсутствия эффективных лицензированных средств их оперативной диагностики, специфической профилактики и лечения [47; 84; 86; 617]

Вышеизложенные факты обусловили необходимость проведения опережающих исследований по разработке средств и методов противодействия опасности появления, распространения трансграничных болезней животных, обеспечивающих, соответственно, своевременную

индикацию и идентификацию возбудителя, формирование раннего стойкого защитного иммунитета [28; 33; 47; 80; 86; .].

Возникающие и вновь возвращающиеся возбудители инфекционных болезней создают ряд проблем их диагностики, обусловленных постоянно происходящим изменением природы возбудителя [96; 173; 206; 342; 390; 450]. Изучение структуры отдельных компонентов вириона, механизмов взаимодействия микро- и макроорганизма с целью понимания патогенеза болезни, невозможно без использования МКА узкой направленности, способных выявлять даже незначительные изменения в антигенных эпитопах патогена [1; 24; 58, 2008; 298]. Своевременное проведение диагностических мероприятий, оценка эпидемической и эпизоотической ситуации, разработка комплексной программы профилактики инфекций требует применение широкого спектра методов, основанных на использовании достижений современной науки, молекулярных и нанобиологических технологий. В настоящее время рекомбинантные технологии являются неотъемлемой частью при разработке диагностических тест-систем и средств профилактики инфекционных болезней [41; 44; 83; 297].

Успехи современной молекулярной биологии и гибридной технологии позволяют создавать уникальные препараты стандартизированных МКА и рекомбинантных аналогов вирусных белков, обеспечивающие высокую чувствительность, эффективность и безопасность методов диагностики и средств профилактики.

1.2. Степень разработанности проблемы

Несмотря на значительные успех, достигнутые в изучении патогенности вирусов, эпизоотологии, диагностики и профилактики, проблема борьбы с ЛДР, гриппа птиц и б. Ньюкасла и в настоящее время остается актуальной.

Сотрудниками нашего института внесен значительный вклад в изучение вирусов ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла, разработку средств и методов диагностики, специфической профилактики этих болезней [Сафоновым Г.А., Володиной Л.И., Лагуткиным Н.А., Зубаиловым М.М., Орловым А.А., Кушниром А.Т., Жигалевой О.Н., Пантюшенко М.С., Перепечко В.С., Соковых Л.И., Романовой В.П., Середа Л.И., Вергун Л.Ю., Южук Т.Э., Стрельцовым Л.Ф., Кулицей М.М., Лукшиным А.А., Колосовой М.В., Хухоровой И.Ю., Закутским Н.И. Сальниковым Н.И., Иматдиновым И.Р.]. Однако методы диагностики и профилактики инфекционных болезней требуют постоянного совершенствования. По-прежнему остро стоит вопрос диагностики ЛДР, гриппа птиц, болезни Ньюкасла и их специфической профилактики, обусловленный высокой антигенной вариабельностью возбудителей [33; 2; 83; 41; 68; 617; 391.], появлением новых реассортантов [79; 368; 148; 163; 264; 142; 456; 498; 610]. Несмотря на значительное количество работ в области вакцинопрофилактики ЛДР и гриппа птиц необходимость эффективной, безопасной, «идеальной» вакцины остается актуальной. [46; 618]. Сходство организации генома, функций основных вирусных белков представителей семейств *Bunya*-, *Orto*-, *Paramixoviridae* [604; 566; 598], позволяет использовать вирусы гриппа птиц и болезни Ньюкасла в качестве модели при отработке подходов создания средств и методов диагностики и специфической профилактики ЛДР, ввиду высокой опасности ее возбудителя [455; 128].

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности проведения научно-исследовательской работы по созданию и совершенствованию средств и методов ранней диагностики, мониторинга и специфической профилактики указанных инфекционных болезней на основе достижений современной биотехнологии, молекулярной биологии, иммунологии и является основополагающим в выборе темы диссертационной работы.

1.3. Цель и задачи исследований. Основной целью исследований являлась разработка средств и методов ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла; подходов создания средств и стратегий специфической профилактики особо опасных инфекций (на примере ЛДР и гриппа птиц H5) на основе достижений молекулярной биологии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить реактивность рекомбинантных белков и плазмид, кодирующих гены иммунодоминантных белков вирусов ЛДР и гриппа А;
- усовершенствовать на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных аналогов структурных белков вирусов способ получения моноклональных антител заданной узкой специфичности и изучить их иммунохимические свойства;
- разработать и усовершенствовать методы ранней диагностики и серологического мониторинга лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла;
- определить кандидатный штамм вируса ЛДР для разработки, в перспективе, инаktivированной вакцины против ЛДР;
- отработать лабораторные методы и подобрать лабораторную модель для контроля качества вирусного сырья; безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инаktivированного антигена вируса лихорадки долины Рифт;
- отработать методы повышения антигенной и иммуногенной активности инаktivированного антигена вируса ЛДР и ДНК-конструкций;

- разработать оптимальные стратегии индукции раннего иммунитета против гриппа птиц подтипа H5 и лихорадки долины Рифт;
- разработать (на примере ЛДР) схему системных подходов обеспечения готовности противодействия, в случае угрозы возникновения, особо опасных инфекций.

1.4. Научная новизна.

Научная новизна работы состоит в создании средств и методов ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла; различных методических подходов разработки стратегий прайм-бустерной иммунизации для профилактики ЛДР и гриппа птиц подтипа H5; схемы научно-обоснованных мер по обеспечению контроля ЛДР, позволяющих решить проблему противодействия появлению и распространению особо опасных инфекций на свободные территории.

Впервые в РФ разработаны:

- способ получения МКА направленной специфичности с использованием рекомбинантной плазмиды, несущей вставку гена гликопротеина Gn вируса ЛДР и соответствующего рекомбинантного аналога, позволяющий получать в короткие сроки высокий процент (75-80%) положительных клонов гибридом, продуцирующих МКА, в большинстве своем (58%) специфичные к конформационным эпитопам вирусного антигена;
- показана способность МКА, полученных к рекомбинантному белку Gn, синтезируемому *in vivo* и *in vitro*, выявлять в различных серологических реакциях, в том числе иммуноцитохимическим методом, антигенные детерминанты гликопротеина Gn вируса ЛДР;
- различные форматы ИФА, способные выявлять антигенные детерминанты нуклеопротеина вирусов ЛДР, гриппа птиц, болезни

Ньюкасла; специфические антитела к данным вирусам. Использование рекомбинантного аналога NP вируса ЛДР обеспечивает повышение чувствительности и специфичности метода; позволяет дифференцировать в угрожаемой по ЛДР зоне инфицированных животных и привитых инактивированной или ДНК_{Gn/Gc} вакцинами;

- методы ОТ-ПЦР, обеспечивающие надежное выявление в образцах инфицированного материала РНК вирусов гриппа птиц подтипа H5N1 и ЛДР, позволяющие дифференцировать их от других вирусов - представителей соответствующих семейств; ОТ-ПЦР с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов, позволяющие выявлять геном вируса ЛДР и дифференцировать вирулентные и аттенуированные штаммы;

- дано научно-практическое обоснование использования аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» вируса ЛДР в перспективе разработки инактивированной вакцины, молекулярно-биологические свойства, которого обеспечивают экологическую безопасность, эффективность вакцины для применения в угрожаемой зоне;

- научно обоснованы и экспериментально подтверждены на лабораторной модели (аутбредные белые мыши): эффективность стратегий прайм-бустерной иммунизации против ЛДР и гриппа птиц подтипа H5 на основе использования рекомбинантных ДНК, кодирующих иммунодоминантные белки вирусов гриппа птиц (HA5 и NP) и ЛДР (Gn и Gc), ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР, которые обеспечивают развитие раннего специфического иммунитета у привитых животных, в том числе протективного; повышение иммунологической эффективности ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР.

Разработана на примере ЛДР схема системных технологий, определяющая, на основе данных среднесрочного (5-6 мес.)

прогнозирования, комплексный подход по обеспечению готовности противодействия в случае угрозы возникновения особо опасных и экзотических инфекций.

Новизна полученных результатов подтверждена патентами на изобретение № 2409384, 20.01.2011 г.; № 2457255 от 27.07.2012 г.; № 2534343 от 27.11.2014 г.

1.5. Теоретическая и практическая значимость результатов исследования.

Научно-практическое значение работы вытекает из результатов исследований.

Проведенные исследования на основе достижений современной молекулярной биологии и биотехнологии, ориентированы на разработку средств и методов ранней диагностики особо опасных инфекций таких, как ЛДР, грипп птиц, б. Ньюкасла и методических подходов разработки средств и стратегии специфической профилактики ЛДР и гриппа птиц подтипа H5, что представляет, как научно-теоретическую, так и практическую значимость работы для ветеринарной медицины.

Экспериментально подтверждены теоретические основы получения высокоактивных специфичных МКА к Gn/Gc вируса ЛДР с использованием генноинженерных конструкций и рекомбинантных белков, позволяющие значительно сократить сроки получения специфических моновалентных и моноклональных антител; повысить выход специфических клонов гибридом, продуцирующих МКА, специфичные к конформационным эпитопам антигена.

Разработаны различные форматы ОТ ПЦР (ЛДР, грипп птиц H5N1) и ИФА для ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла позволяющие выявлять геном и антигены вирусов на ранних стадиях их

репродукции; дифференцировать штаммы по вирулентности; от других вирусов, представителей соответствующих семейств.

Разработаны тест-система ИФА «Набор препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и б. Ньюкасла», СТО ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии № 00495549-00112006 и Инструкция по применению, утвержденные заместителем руководителя Россельхознадзора 31.10.2006 г. регистрационный номер ПВР-1-3.6/01714. «Набор препаратов...» внедрен в ветеринарную практику и использовался во время эпизоотий гриппа птиц в РФ.

Разработаны критерии и лабораторные методы оценки качества вируссодержащего материала и инаktivированного антигена вируса ЛДР, его антигенности и иммуногенности с использованием лабораторной модели (аутбредные белые мыши).

Подтверждена экспериментально концепция активации системы врожденного и стимуляции развития адаптивного иммунитета в результате ДНК-иммунизации, которая приводит к праймированию иммунной системы; индукции раннего клеточного и специфического гуморального иммунитета у привитых животных; повышению иммунологической эффективности инаktivированного антигена вируса ЛДР.

Предложена стратегия гетерогенной прайм-бустерной иммунизации, вакцинации восприимчивых животных против ЛДР в угрожаемой зоне; обеспечивает эффективность стратегии дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (DIVA) с применением ТФ ИФА на основе которой может быть использована для получения моносpezifических и моноклональных антител к отдельным белкам или их фрагментам, для рекомбинантного нуклеопротеина и соответствующих МКА.

Предложена схема системных технологических решений, использование которых позволяет в короткие сроки получить биологически

активные препараты на основе применения рекомбинантных плазмид и белков; обеспечить создание и производство средств ранней диагностики и профилактики ЛДР в случае угрозы возникновения болезни.

Научно-практическое значение работы подтверждается разработкой 6 методических указаний (положений) по выявлению и идентификации возбудителей гриппа птиц подтипов H5, H7 и N1; ЛДР; по получению МКА к антигенным детерминантам: HA5 и HA7 гриппа птиц; фосфопротеину р30 вируса АЧС, утвержденных в установленном порядке в 2006-2013 гг.

1.6. Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждена статистической обработкой данных, включающей расчеты средних арифметических значений, корреляционного анализа, стандартных отклонений результатов с помощью программы Microsoft Office Excel 2007, и актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке. Научные положения, выводы, практические предложения диссертационной работы аргументированно отражают ее содержание.

Основные положения диссертационной работы и методическая основа ее выполнения доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии; на секции Инфекционная патология Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (2009-2013 гг.); представлены на международных и региональных научно-практических конференциях: Международной Российско-Американской научно-практической конференции г. Москва «Болезни диких животных» 2007 г.; Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2012 г.), «Актуальные вопросы ветеринарной медицины Сибири», Улан-Уде, 2013 г.; на конференции «Биоиндустрия 2013» в рамках Петербургского международного форума «Здоровье», Санкт-Петербург, 2013 г. Практические аспекты применения научных

разработок были представлены за период 2002-2014 гг. на семинарах в «Учебном центре по подготовке, переподготовке и повышению квалификации специалистов ветеринарных лабораторий субъектов Российской Федерации» ФБГУ ЦНМВЛ (г. Москва).

В рамках выполнения диссертационной работы опубликовано 50 печатных работ, из них 13 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций. Приоритетность результатов исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретение.

1.7. Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

- Антигенные и иммуногенные свойства рекомбинантных и гибридных белков Gn, Gc, NC вируса ЛДР; NP вируса гриппа А, полученных, соответственно *in vitro* в прокариотической системе экспрессии и синтезируемых *in vivo*, позволяют использовать их в качестве иммуногенов и антигенов при получении специфических антител и конструировании тест-систем нового поколения.

- Способ получения линий гибридом, стабильно продуцирующих МКА к отдельному белку или фрагменту белка на основе использования ДНК-конструкций и соответствующих рекомбинантных белков. Способ обеспечивает возможность получения в короткие сроки МКА к новому антигену с известной нуклеотидной и аминокислотной последовательностью.

- Методы ранней диагностики и мониторинга ЛДР, гриппа птиц и б. Ньюкасла: тест-системы на основе ОТ ПЦР (грипп птиц H5N1, ЛДР); различные форматы ИФА на основе МКА и рекомбинантных белков, которые позволяют в первые 1-5 суток после заражения выявлять в

инфицированном материале, соответственно, геном и антигенные детерминанты белков указанных вирусов, специфические антитела к ним.

- Стратегия гетерогенной системы праймирования и бустирования различными методами доставки иммуногена обеспечивает активацию врожденного и развитие раннего адаптивного иммунитета обоих звеньев; повышение иммунологической эффективности ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР; возможность применение DIVA концепции с использованием непрямого ТФ ИФА на основе рекомбинантного NP и соответствующих МКА.

1.8. Личный вклад соискателя.

Основной объем исследований проведен автором самостоятельно. Личный вклад автора в исследования, вошедшие в диссертацию, был определяющим. Соискатель, как научный сотрудник ГНУ ВНИИВиМ Россельхозакадемии осуществлял планирование всех экспериментов по теме работы и принимал непосредственное участие в их проведении, участие соавторов отражено в ссылках по тексту работы и совместно изданных научных публикациях. Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ грантами № 12-04-31378 и № 11-08-01245а.

1.9. Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 306 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения. Список используемой литературы включает 630 источников, в том числе зарубежных авторов 536. Работа иллюстрирована 25 рисунками, 42 таблицами. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их научную новизну и практическую значимость.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Эпизоотическая обстановка по особо опасным зооантропонозным инфекциям, вызываемым представителями *Mononegavirales*

Многие инфекционные болезни представляют угрозу жизни и здоровья не только для конкретного индивидуума, но для общества в целом. Быстрое и неконтролируемое распространение инфекционных болезней может привести к развитию эпидемии или даже пандемии в течение весьма короткого периода времени. В последнее время происходит расширение ареала распространения инфекционных болезней, увеличение видового спектра носителей, повышение вирулентности циркулирующих штаммов. Внезапное появление и широкое распространение арбовирусных инфекций далеко за пределы энзоотических зон (блютанг, лихорадка Западного Нила, африканской чумы свиней) обуславливается миграцией их членистоногих переносчиков [182; 508; 535; 454], способностью вирусов к адаптации в других экосистемах [507; 558].

К тому же, по мнению ученых Ливерпульского университета, проанализировавших базу данных по вспышкам инфекционных болезней, эпизоотии/эпидемии по времени совпадают с явлением Эль-Ниньо – небольшими колебания температуры в приповерхностном слое экваториальных вод Тихого океана, которые, как уже доказано провоцируют аномальную жару, засуху, пожары, влияют на температуру и периодичность длительных проливных дождей. От этих факторов напрямую зависит популяция переносчиков арбовирусных инфекций [111; 182; 183; 397].

Расширение торговых и социальных взаимоотношений РФ со странами мира, в том числе неблагополучными по особо опасным инфекциям также способствует увеличению вероятности появления этих болезней. Так по данным отдела эпидемиологического надзора за особо опасными инфекциями в результате обследования методом ИФА-IgM (MAC-ELISA) в 2012 г. было

идентифицировано 60 случаев инфекций, завезенных в Россию из тропических и субтропических стран [31; 49].

2.2. Характеристика вирусов - отдельных представителей семейств *Ortomixoviridae*, *Paramixoviridae* и *Bunyaviridae* порядка *Mononegavirales*

Особое внимание научной общественности привлекают вирусы, представители порядка *Mononegavirales* (MV-вирусы), объединяющего вирусы, геном которых представлен отрицательной одноцепочечной РНК и включающего семейства, имеющие несегментированный геном - *Bornaviridae* (болезнь Борна), *Filoviridae* (Марбург, Эбола), *Rhabdoviridae* (Бешенство, Везикулярный стоматит, рабдовирусы растений), *Deltaviridae* (Гепатит D), *Paramyxoviridae* (вирусы парагриппа, кори, Сендай; чума КРС, МРС, собак; болезнь Ньюкасла) и семейства, имеющие сегментированный геном - *Bunyaviridae* (хантавирусы, буньявирусы, тосповирусы, флебовирусы - ЛДР), *Ortomyxoviridae* (вирусы гриппа А, В, С, D), *Arenaviridae* (Лимфоцитарный хориоменингит, лихорадка Ласса), [214; 231; 295; 296; 358; 391; 550; 568].

Несмотря на то, что вирусы отряда *Mononegavirales* имеют различных хозяев и различные морфологические и биологические свойства, они обладают многими общими свойствами, такими как геномная организация и элементы, необходимые для обычного способа репликации и экспрессии генов [136; 166; 181; 190; 391; 550; 579; 603; 604; 623]. Эти покрытые оболочкой вирусы реплицируются в цитоплазме клеток и синтезируют мРНК, которой не требуется сплайсинг [240; 481].

Геном вирусов имеет отрицательную полярность и не кодирует белки. Для синтеза вирусных белков в вирионе вирусов, имеющих одноцепочечную минус-нить РНК обязательно должна содержаться РНК-зависимая РНК-полимераза. мРНК синтезируется РНК-зависимой РНК-полимеразой (англ. RdRp)

Вирусы этого отряда состоят из двух главных функциональных единиц, рибонуклеотид-белкового комплекса (RNP) и оболочки. Структура и организация геномов вирусов отряда *Mononegavirales* являются сходными и обусловлены определенным типом экспрессии генов. Геномы всех MV-вирусов содержат три основных гена, кодирующих: нуклеопротеин (N или NP), фосфопротеин (P) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L). Оболочка вируса состоит из матричного (M) белка (кроме *Bunyamveridae*) и одного или нескольких трансмембранных гликопротеинов (например, белков G, HN и F), которые принимают участие в сборке/отпочковывании вирусных частиц, а также в процессе присоединения к клетке и/или проникновения вируса в клетку. В зависимости от рода, к которому принадлежит вирус, количество белков может быть увеличено за счет вспомогательных белков, имеющих определенные специфические регуляторные функции при транскрипции и вирусной репликации, или белков, которые вовлечены в реакции вирус-хозяин (например, белки C, V и NS). Порядок расположения генов в направлении от 3' к 5'-конце в геноме MV-вирусов консервативен и является способом регуляции транскрипции, причем основные белки находятся на 3'-конце или рядом с ним, а большой (L) ген расположен в 5'-конце [217; 156; 164; 203; 464; 478].

В комплексе RNP геномная или антигеномная РНК заключены в капсид из белка N и связана с РНК-зависимой РНК-полимеразой, которая состоит из белков L и P. В отличие от других *Mononegavirales* RNP вируса ЛДР не имеет спиральной симметрии, как было показано на электронных микрофотографиях [188; 191]. Matsuoka Y. et al., (388) Raymond D. et al., (478), Donald D. et al., (214) показали, что RNP Буньявирусов образует крупные циклические формы, из-за комплементарности 10-15 дополнительных оснований на 3' и 5' концах каждого геномного сегмента. После заражения клетки, именно комплекс RNP, а не инкапсидированный РНК-геном служит

матрицей для двух различных функций синтеза РНК, т.е. транскрипции субгеномных мРНК и репликации полноразмерной геномной РНК.

В цитоплазме клетки начинается трансляция вирусных белков на синтезированных мРНК на рибосомах хозяина. В некоторых случаях РНК-зависимая РНК-полимераза синтезирует полные копии (+)-антигеномов, которые затем транскрибируются в (-)геномные РНК. Синтезированные вирусные белки и геномные (-)РНК в ходе самосборки объединяются в вирусные частицы и накапливаются вблизи плазматической мембраны. Вирионы отпочковываются от клетки, при этом получают оболочки, состоящие из фрагментов плазматической мембраны клетки хозяина [187; 191; 231; 480; 547; 548].

Модульная форма транскрипции генов MV-вирусов, при которой каждый ген является частью отдельного цистрона или транскрипционной единицы, делает эти вирусы необычайно подходящими для встраивания и экспрессии чужеродных генов [156; 161; 168; 275; 283; 333; 554; 598; 603]. Каждая единица транскрипции в геноме MV-вирусов содержит следующие элементы: 3'-GS-открытая рамка считывания (ORF)-GE-5' [161; 454; 460].

Большинство представителей *Mononegavirales*, в том числе лихорадка долины Рифт, грипп птиц и болезнь Ньюкасла относятся к особо опасным трансграничным зооантропонозным болезням, согласно последней классификации МЭБ [45; 46; 295; 356]. По важности социального значения и степени экономического ущерба, вызываемого данными инфекциями трудно выделить какую-либо из них [101; 125; 218; 243; 254; 278; 482; 483; 490; 527]. И не смотря на свою более чем 100-летнюю историю эти болезни и их возбудители остаются серьезной проблемой ветеринарии, здравоохранения оказываются в центре внимания научных исследований ввиду особой опасности для животных и человека [144; 180; 186; 296; 299; 447; 507; 514; 525].

Сходство организации геномов вирусов семейств *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* и вируса ЛДР отряда *Mononegavirales*: функций отдельных белков: гемагглютиниона (НА) и гликопротеинов (Gn, Gc), нуклеопротеина (NP и NC), неструктурных белков (NS1 и NSs), белков слияния (NSm2; F и HA2) позволяют использовать вирусы гриппа и болезни Ньюкасла в качестве модели при отработке отдельных этапов создания средств диагностики и специфической профилактики ЛДР в виду высокой ееопасности вируса ЛДР для человека [585; 535; 589; 579; 625; 626].

2.2.1. Характеристика вируса гриппа А

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*. Вирусы гриппа А распространены в природе и поражают целый ряд млекопитающих животных, птиц и человека и представляет собой угрозу здоровья мировой общественности ввиду быстрой и непредсказуемой эволюции вируса [286; 347; 375; 391; 434; 507]. Вирусы гриппа типов В и С выделены только от человека. Классификация типов вирусов основана на антигенных различиях поверхностных гликопротеинов – гемагглютиниона (НА) и нейраминидазы (NA).

Недавно был выделен новый тип в семействе *Orthomyxoviridae* [299] предварительно названный *Influenza virus D*: в 2011г. в США от свиней, в 2013 от КРС; в 2012 г. во Франции от КРС и свиней; в 2014г. в Китае от свиней [273; 274; 626]. Вирус не является рекомбинантным, идентичность изолятов, выделенных в разных странах, даже континентах подтверждена, что свидетельствует об общем происхождении этих новых вирусов гриппа [183].

Грипп типа А по-прежнему представляет собой серьезную угрозу здоровья мировой общественности из-за быстрой и непредсказуемой эволюции вируса [2; 15; 44; 84; 102; 125; 443; 610; 624; 627]. Их можно выделить в любом уголке Земли. На сегодняшний день описаны 17 антигенных подтипов НА вируса гриппа А, которые согласно 3-D-структуре

эктодоменов образуют две эволюционные группы: Группу-1 (H1-Группа) и Группу-2 (H3-Группа), включающие, соответственно, 3 клада (H1, H2, H5, H6, H17); (H8, H9, H12); (H11, H13, H16) и 2 клада (H3, H4, H14); (H7, H10, H15) [434; 436; 499; 498].

По данным Suarez D.L. et al., (549), МЭБ (2011) с 1959 года произошло двадцать девять эпизоотий высокого патогенного гриппа птиц (HPAI; ВППП). Межвидовая передача вируса гриппа А является важным фактором в эволюции и экологии вируса [384; 375; 387], что подчеркивается регулярными регистрируемыми по сей день вспышками гриппа подтипов H5, H7, H1; возникновением случаев заражения человека вирусом гриппа птиц по настоящее время [384; 125; 627]; появлением нового реассортантного вируса гриппа А свиного происхождения с антигенной формулой H1N1 в 2009-2011 гг. и выявлением нового слабопатогенного для птиц вируса гриппа птиц с антигенной формулой H7N9 в Китае 2013 г., вызывающего у людей заболевание нижних дыхательных путей со смертельным исходом. [286; 319; 443; 498; 499; 254].

Структура и функции генома вирусов гриппа А изучены достаточно подробно. В развитии инфекции основная роль принадлежит вирусным белкам НА, NA, NP, M2, NS1, PB1-F2. Геном вирусов гриппа А и В представлен сегментированной одноцепочечной минус-РНК, содержащий 8 дискретных сегментов, каждый из которых инкапсидирован с несколькими копиями NP и одного тримера полимераз (PB1, PB2 и PA) с образованием частиц рибонуклеотидного комплекса [266; 347; 434; 511; 559]. Геном кодирует 11 вирусных белков.

Оболочка вирусов гриппа содержит гемагглютинин, нейраминидазу и матриксный белок М2. НА представляет собой гликозилированный тип 1 интегральный мембранный белок с функциями и рецепторсвязывающего белка, и белка слияния. Матриксный белок М1 находится под мембраной и

взаимодействует с цитоплазматическим доменом вирусного поверхностного гликопротеина, а также с рибонуклеиновым комплексом. Нейраминидаза (NA) является вторым интегральным гликопротеином с сиалидазной ферментативной активностью, необходимой для расщепления мембраны клетки-хозяина. HA и NA являются основными антигенными мишенями гуморального иммунного ответа на вирус гриппа

Гемагглютинин – один из самых крупных белков в вирионе гриппа, который выполняет функции, крайне важные для развития инфекционного процесса: взаимодействует со специфическим для вируса гриппа клеточным рецептором - сиаловой кислотой [391; 546], участвует в проникновении вируса в клетку, путем слияния вирусной мембраны с клеточной и слияния вирусной мембраны с эндосомальной в процессе «раздевания» вируса [549]; наконец, именно против гемагглютинина направлены антитела, нейтрализующие инфекционность вируса гриппа [511; 563]. Поверхностный шип гемагглютинина представляет собой тример, состоящий из идентичных субъединиц, обозначаемых как HA0 (молекулярная масса 75 кДа). Каждая из субъединиц состоит из двух полипептидов – HA1 (тяжелая цепь гемагглютинина) и HA2 (легкая цепь гемагглютинина) [17; 189]. Субъединицы HA1 и HA2 соединены между собой дисульфидными связями, которые играют важную роль в стабилизации конформации HA[549]. Рецептор-связывающий сайт и антигенные детерминанты (Sa; Ca1; Ca2 и Cb) локализованы в области большой глобулы гемагглютинина [546].

Расщепление молекулы HA0 на тяжелую и легкую цепи по аргинину или лизину является необходимым условием инфекционности вируса, распространения вируса в зараженном организме, тропизма к тканям и вирусной патогенности, для проникновения вируса в клетку, формирования инфекционной частицы на последнем этапе репродукции вируса [191; 498; 507; 565; 280]. Существуют различия в специфике эндопротеаз клетки-хозяина (сериновые или фуриновые), которые распознают различные мотивы

последовательностей в сайте его расщепления [319; 511]. Так сериновые протеазы «узнают» в основном последовательности одноосновных аминокислот в сайтах расщепления НАвирусов гриппа млекопитающих и непатогенных вирусов гриппа птиц. [549; 550; 552]. Фуриновые протеазы, распространенные повсеместно, «узнают» сайт расщепления, состоящий из многоосновных аминокислот. Такой сайт расщепления характерен для высокопатогенных вирусов гриппа птиц, вызывающих генерализованные инфекции [552; 549]. Легкая цепь гликопротеина НА2 –пептид слияния. Структура пептида слияния детально охарактеризована [191]. У С-конца молекулы НА2 находится трансмембранный домен, который заякоривает гемагглютинин в липидной мембране вируса, за ним следует так называемый цитоплазматический «хвост» [323; 546], который играет существенную роль при сборке вирусных частиц и упаковке вирусного генома [625; 387; 319]. Мы подробно остановились на характеристике НА вируса гриппа, чтобы показать сходство функций и строения НА вируса гриппа А и гликоротеинов вируса ЛДР.

2.2.2. Характеристика вируса болезнь Ньюкасла

Последние годы вирус болезни Ньюкасла представляет повышенный интерес не только из-за высокого потенциала патогенности, но и вследствие обнаружения его онколитической способности, а также использования лентогенных (рекомбинантных) штаммов вируса в качестве вектора при разработке рекомбинантных вакцин против инфекционных болезней животных и человека [330; 278; 165; 168; 283; 333].

Вирус болезни Ньюкасла (NDV), вызывающий во всем мире болезнь птиц отряда куриных, принадлежит к роду *Avulavirus* семейства *Paramyxoviridae* и имеет несегментированный, отрицательный РНК-геном, состоящий из шести транскрипционных единиц (3'-NP-ПМФ-НН-L-5' ») [364; 321; 322]. Вирус болезни Ньюкасла имеет один иммуно- и серотип. Однако

штаммы вируса разделены по патогенности на патотипы и на основе размера генома на два класса [49; 68; 91; 359]. Существует две системы классификации, выделяя линии или генотипы возбудителя [100; 101; 104]. Класс I (9 генотипов) и II (11 генотипы) [103; 423]. Штаммы класса I, как правило, авирулентны и имеют длину генома 15198 нуклеотидов (NT). Класс II содержит как вирулентные и авирулентные штаммы. Штаммы класса II выделенные до 1960 (генотипы I - IV и IX) имеют геномы 15186 нт, в то время как более поздние штаммы (генотипы V - VIII и XI) имеют геномы 15192 нт. Появление новых вирулентных генотипов, наблюдаемые изменения генетической последовательности происходит в результате их одновременной циркуляции, благодаря огромному многообразию видов птиц, восприимчивых к болезни Ньюкасла. Таким образом, ВБН является разнообразным и постоянно развивающимся вирусом [509, 277; 100; 101]. В настоящее время циркулируют связанные со вспышками болезни преимущественно штаммы, относящиеся к V-VIII генотипам II класса [278; 363; 366].

Эксперты МЭБ подчеркивают, что для предупреждения НБ, необходимо постоянно поддерживать высокий уровень охвата прививками [614]. Для профилактики этой болезни в мире и РФ выпускаются и применяются вакцины на основе 5 штаммов: La Sota, B1, Бор/74 ВГНКИ, Н, и ГАМ-61, относящиеся ко II генотипу второго класса [91; 69; 55]. При этом необходимо учитывать факты, что вирулентные вирусы НБ могут инфицировать и размножаться в организме вакцинированных птиц, в отсутствие клинических признаков болезни. Появляются непрерывные сообщения о вспышках ВБН, значительно влияющих на экономику национальных отраслей птицеводства, несмотря на применение различных программ вакцинации [50; 243; 408]. Так в Японии, Западной Африке, Индии зарегистрированы вспышки болезни Ньюкасла, почти со 100% смертностью, несмотря на применение коммерческой вакцины из штамма LaSota [585; 540; 173; 604].

Проведенный молекулярно-генетический анализ изолятов, выделенных на территории РФ и некоторых сопредельных государств - Украины, Казахстана, Киргизии - показал, что охарактеризованные изоляты относятся преимущественно к генотипам VI и VII (a, b, d) II класса, большинство из которых являются велогенными, что делает их потенциально опасными [17; 49; 68; 79]. Последовательность сайта расщепления белка F является основным фактором, определяющим патогенность ВБН [443; 408]. Выделенные изоляты генотипов VI и VII (a, b, d) обладают опасной последовательностью сайта расщепления F белка (RRRKR ↓ F). Имеются все предпосылки распространения указанных генотипов на территории РФ из азиатских стран [69]. Perozo F. (2008), Miller J. (2010), Morla P. (2014); Gogo S. (2015) показали тождество аминокислотной последовательности белков вируса болезни Ньюкасла между полевыми изолятами и штаммами La Sota и B1 (имеющими 99% идентичность между собой) составляющее от 82% - P, 87% - HN, до 91-93%, – N и L. [445; 399; 402; 255]. Что указывает на существенное отличие изолятов от применяемых вакцинных штаммов. [227; 358; 359]

2.2.3. Характеристика вируса лихорадки долины Рифт

Тенденция географического распространения. С момента регистрации 1912 г. [195; 142; 161; 235] и определения вирусной природы ЛДР в 1931 г. [194] географическое распространение болезни охватывает практически всю территорию Африки (рисунок 2), причем отмечается преодоление не только больших расстояний, но и водных преград – Красное море в 2000-2001 г.г. – появление ЛДР на Аравийском полуострове в Саудовской Аравии и Йемене [105; 120]; в 2007 г. в 1991 году - на о. Мадагаскар [173; 302; 417; 468], в 2007 г. - на Коморских островах и Майотте в Индийском океане [124; 178; 528; 487]. Не говоря уже о регулярно повторяющихся эпизоотиях и эпидемиях болезни более, чем в 30 странах Африканского континента [113; 232; 538; 558; 613; 421; 464; 225; 98]. Период 2007-2010 гг. отмечен вспышками ЛДР, причем практически одновременно в различных, территориально не связанных точках

континента, далеко удаленных друг от друга, что является характерной особенностью этой болезни (рисунок 1) [113; 417; 612; 618].



Рис. 1 - Страны с подтвержденными случаями ЛДР июль 2009-ноябрь 2010. Данные получены из ProMed-mail (International Society For Infectious Diseases [<http://www.promedmail.org>])

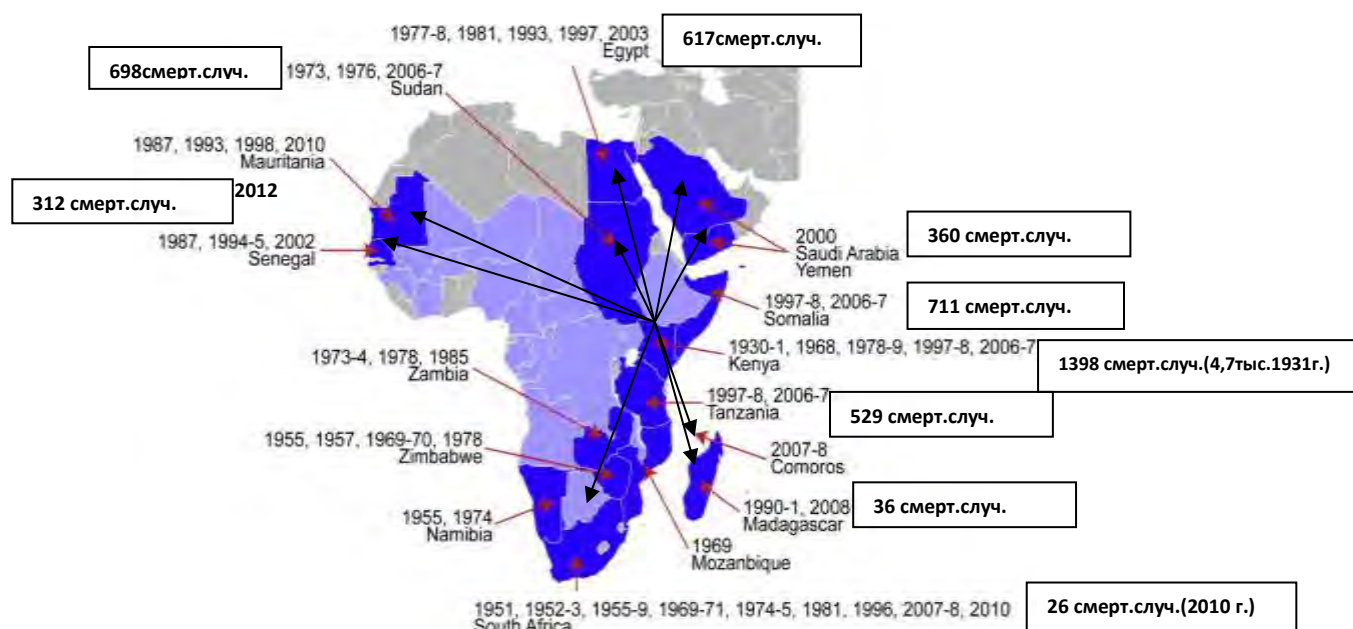


Рис. 2 – Карта Африки, Аравийского полуострова и прилегающих островов, иллюстрирующая пространственное и временное распространение лихорадки долины Рифт с первого подозрения в 1912 году. Серый цвет – нет сведений о распространении ЛДР; голубой - сероконверсия ЛДР; синий - эндемичные зоны ЛДР с периодическими вспышками эпизоотий/эпидемий. Датами обозначены официально зарегистрированные значительные эпизоотии, в рамках количество смертельных случаев среди заболевших пациентов. [RVFdistributionmap. Atlanta: CDC., <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/rvfmap.htm> (accessed May 2013)].

По прогнозам многие регионы в настоящее время свободные от ЛДР могут оказаться зонами повышенного риска, такие как дельта рек Тигр,

Евфрат и Инд [249], страны Средиземноморского бассейна [182; 418], а также страны, где присутствуют компетентные векторы [206; 386; 418; 577; 576; 47].

Следует также отметить, что наряду с сокращением межэпизоотического периода, как отчетливо видного на примере Египта [242; 348; 395; 396; 293; 98]; Мавритании: –2008-2010; 2012гг. [538; 539; 540]; Южной Африки [113; 417; 262; 582], повышается процент и усиление тяжести осложнений среди заболевших в виде отсроченного не воспалительного энцефалита и почечного синдрома, ретинита, вплоть до полной потери зрения [106; 186; 188; 195; 97; 346; 459; 524; 527]. Также установлена циркуляция вируса среди верблюдов и КРС и тенденция вовлечения их в эпизоотическую цепь на о. Мадагаскар и в Западной Африке [221; 222; 167; 340; 417; 428].

Лихорадка долины Рифт (ЛДР), считается одним из самых важных вирусных зоонозов в Африке и, в отличие от большинства арбовирусов, передается не только через переносчиков (комарами), но и при непосредственном контакте с инфицированным материалом. Вирус ЛДР патогенен для большого круга жвачных животных, вызывая внезапные массовые аборт практически у 100% беременных животных и практически 100% гибель молодняка до 14 суточного возраста.

Вследствии тяжести проявления ЛДР и способности аэрозольной передачи возбудителя, она считается одной из основных зоонозных угроз и относится к наиболее опасным инфекционным трансграничным болезням животных [346; 617; 618]. Раннее выявление болезни и принятие необходимых мер, которые важны для минимизации последствий вспышки, требуют глубокого понимания механизмов передачи, распространение и устойчивости вируса.

*Возбудитель ЛДР (RVF_v) РНК-содержащий вирус был классифицирован как член рода *Phlebovirus* семейства *Bunyaviridae* в 1980 г. на основе серологических тестов, показавших антигенное родство вируса с представителями рода *mosquit* лихорадок [161; 517; 520; 556]. Вирус ЛДР*

представляет интересную модель для изучения в качестве примера генетической стабильности арбовирусов в природе.

Геном вируса ЛДР представлен тремя сегментами, обозначенными соответственно размеру L, M, S плотно связанными с РНК-зависимой РНК-полимеразой и субъединицами нуклеокапсидного белка, защищающего геном [220; 554; 558; 599]. Все три генных сегмента вируса имеют одинаковые комплементарные нуклеотиды на 3' и 5'-концах. Концевые нуклеотидные последовательности высоко консервативны у вирусов одного рода и отличаются от таковых вирусов другого рода. Основным белком нуклеокапсида вируса ЛДР, как и у всех буньявирусов — негликозилированный полипептид N, который тесно связан с РНК, образуя рибонуклеопротеин. Рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс, имея кольцевую форму, окружен двухслойной липидной оболочкой с выступающими над поверхностью пепломерами гликопротеинов Gn и Gc [249; 263]. Состав вирионных липидов отражает состав мембран клеток, используемых для их размножения. L-сегмент является крупнейшим из всех сегментов [142; 419], кодирует L белок, который является РНК-зависимой РНК-полимеразой, катализирующей синтез РНК на РНК-матрицах. Этот белок является многофункциональным ферментом, используемым для транскрипции и репликации [249; 419].

M-сегмент имеет сложную стратегию кодирования. На одной рамке считывания кодируются два основных гликопротеина Gn и Gc и два неструктурных белка 78 кДа и 14 кДа, обозначенных, соответственно, NSm1 и NSm2 [139; 141; 204; 251; 609; 608;]. Nofon C.K. et al., (435) показали, что при заражении коз вирусом, полученным в клетках насекомых и млекопитающих вызывал различный эффект. Они предполагают, что белки NSm1 и NSm2 играют важную роль в размножении вируса у комаров, способствуют увеличению инфекционности вируса для некоторых иммунных клеток. Пять стартовых кодонов AUG остаются консервативными среди 33 экологически разнообразных штаммов и изолятов ЛДР [159; 160; 128; 138; 143]. Зрелые гликозилированные гликопротеины Gn (56 кДа) и Gc (65 кДа) иницируются

от четвертого или пятого кодонов. Гликопротеины Gn и Gc образуют гетеродимеры [159; 236]. Цитоплазматический хвост гликопротеинов взаимодействует (прикрепляется) с РНП [175; 442], выступая в качестве посредника в сборке вирионов [513; 496]. В отличие от большинства других вирусов с негативной цепью РНК, *Bunyaviruses* не имеют матричного белка. Гликопротеины Gn и Gc незаменимы для репликации вируса, созревания белков, экспрессии гликопротеинов на клеточной поверхности, рН-индуцированного слияния клеток, созревания и жизнеспособности вируса. Гликопротеины вируса ЛДР также несут ответственность за слияние и захват вирионов при инфицировании. Гликопротеин Gc принимают непосредственное участие в адсорбции вируса на чувствительных клетках с помощью механизма слияния II класса [246; 234; 609; 603].

Overby A.K. et al., (442), Shi X. et al., (513) с соавт. показали, что правильный фолдинг Gc зависит от шаперон-подобной деятельности Gn. Они обнаружили, что гликопротеины образуют гетеродимер непосредственно на поверхности вирус-инфицированных клеток [285; 512]. Gerrard S.R. et al., (251; 252), Guu T.S. et al., (263) определили, что меньший белок Gn был замаскирован большим Gc белком, подобно гликопротеинам вируса Синдбис (сем. *Togaviridae*, род *Alphavirus*), у которого белок E1 погружен почти полностью в структуру вируса [246; 249; 259].

Гликопротеины G1 и G2 являются специфическими антигенными структурами, вызывающими образование вируснейтрализующих антител [553; 554; 305; 250; 252]. Эпитопы, индуцирующие ВН-антитела, содержатся в G1 и G2, однако защитным действием *in vivo* обладали лишь антитела к G2. На каждом из гликопротеинов идентифицировано по четыре антигенных домена. Антигенные участки, активные в РНГА, являются группоспецифическими, а активные в РН — видоспецифическими. Имея один серо-иммунотип, изоляты вируса лихорадки долины Рифт, выделенные во время эпидемий в различных частях Африки (Египте в 1977 г. и в Мавритании в 1987 г.), отличались между собой в генетическом и антигеном отношении [220; 459; 138]. По

нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательности гена полипротеина Gn/Gc штаммов «1974-ВНИИВВиМ» и «Smithburn's» гомология составила 98,3 и 97,7%, соответственно [Bird В.Н., 2007; Сальников Н.И., 2012; Иматдинов И.Р., 2015]. Анализ нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательностей *gc*-гена, кодирующего гликопротеин Gc показал, что штаммы «RVF(s)113» и «RVF(s)13» наиболее близки со штаммом «Smithburn's» (степень нуклеотидной специфичности 98,4-99%), чем со штаммом «1974-ВНИИВВиМ» [Сальников Н.И., 2012; Иматдинов И.Р., 2015].

S сегмент генома представляет ambisense полярность. Этот сегмент генома кодирует ген неструктурного белка NSs антигеномной ориентации и ген, кодирующий нуклеокапсидный (N) белок в геномной ориентации [288; 149; 591; 450; 478]. Как и многие *Bunyaviridae*, ЛДР синтезирует неструктурный белок NSs [137], стратегия трансляции которого отличается у представителей различных родов. Функции белка NSs известны не полностью. Хотя белок NSs не имеет важного значения для репликации вируса в культуре клеток, он необходим для продуктивной активности вируса *in vivo*. NSs белок отвечает за подавление врожденного иммунного ответа хозяина в целях содействия репликации вируса и считается основным фактором вирулентности вируса [285; 291; 141; 381; 383; 413; 262]. Vialat P. и др. (1997; 2000) показали, что аттенуация вируса связана с делециями в *nss*-гене [583; 584]. Кроме того NSs белок подавляет синтез клеточной РНК и способствует деградации двухцепочечной РНК-зависимой протеиназы R [251; 266; 262; 287; 291; 307].

Высокая частота мутаций вирусной РНК полимеразы может привести к антигенному дрейфу [600]. Например, единственная мутация нуклеотидов в положении 847 гена белка Gn достаточно для изменения вирулентности вируса для мышей [415].

Вирус ЛДР размножается во многих культурах клеток млекопитающих (ВНК-21, Vero и др.) и москитов (*A. albopictus*) [400; 410]. Как и другие вирусы *Bunyaviridae*, он обладает цитолитическим действием в культуре клеток млекопитающих, но не в культуре клеток беспозвоночных.

Большинство вирусов также размножаются с высоким титром в мозге мышечных сосудов. Они проникают в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Все последующие стадии репликации вируса ЛДР происходят в цитоплазме [362; 388; 200; 229; 263; 242]. Вирионы созревают в комплексе Гольджи и отпочковываются через внутрицитоплазматические везикулы, связанные с комплексом Гольджи, транспортируются через цитоплазму и освобождаются экзоцитозом через базолатеральную плазматическую мембрану. Вирусы внутри рода связаны антигенно, но не с вирусами других родов. [138; 156; 157; 221; 462; 517; 566].

Вирус передается животному через укусы насекомых-гематофагов [197; 532; 206; 208; 454; 520], в том числе комаров, принадлежащих в основном к 5 родам *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Eritmapodites* широко распространенных практически на всей территории земного шара; клещей; отдельных видов moskitov [14; 57; 234; 477; 486; 488]. Недавние исследования показали, что и в Европе, и Северной Америке распространены комары этих родов, способных выступать в роли переносчиков вируса ЛДР [182; 186; 574 - 577]. Комары рода *Aedes* способны передавать вирус трансвариально, тем самым поддерживая сохранение вируса в межэпизоотический период. Кроме того есть предположения, что резервуарами вируса могут выступать грызуны (*Nomophila* *Rock Rat* и *Rattus Rattus*) или летучие мыши [469; 592; 171], Африканские буйволы [340; 450], птицы [196]. Хотя комары являются основным вектором, другие пути передачи вируса также имеют место. Не исключается аэрозольный путь заражения при работе с инфицированным материалом [525; 151]. Прямая передача между жвачными через контакт с жидкостью, содержащей вирус, то есть кровью или околоплодной жидкостью, также не исключается [142; 149]. Инфицирование людей происходит в основном через укусы переносчиков и в результате контакта с вирусосодержащим материалом от инфицированных животных, которые содержат большое количество вирусных частиц в крови [234; 521; 557].

Отмечен также ряд фактов вертикальной передачи вируса ЛДР [97; 114; 580; 582; 425].

Факт аэрозольной и вертикальной передачи возбудителя ЛДР увеличивает шанс использования его в качестве агента биотерроризма [405; 108; 119].

Пластичность вируса ЛДР подтверждается распространением его в различных экологических зонах: - так называемых «Дамбос», с четко продемонстрированной корреляцией между ливневыми осадками и появлением вспышек ЛДР [360; 361]; -полузасушливых районах Западной Африки (Сенегал и Мавритании).

Недавние исследования с помощью моделирования показали, что вспышки ЛДР не связаны напрямую с ливневыми осадками. Сезон дождей благоприятно сказывается на высокой плотности основных векторов— *Ae. vexans*, *Ae. Albopictus*, *Ae. aegypti* и *Culex poicilipes* [537].

Компетентный для передачи вируса ЛДР *Culex pipiens* широко распространен в Европе. Еще одним потенциальным вектором вируса ЛДР является распространенный в мире *Aedes albopictus* [357; 402; 404; 575; 576]. Штатные однородные популяции этого вида комаров были выявлены в Албании, Хорватии, Франции, Греции, Монако, Италия, Сан-Марино, Словения и Испания. Изменение европейского климата может облегчить распространение вируса ЛДР в новые районы [486], увеличивая число территорий способных поддерживать циркуляцию вируса ЛДР в природе. Комары вида *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* также были обнаружены на юге РФ [14; 31; 46;].

Сохранение вируса может быть результатом либо вертикальной передачи комарами *Ae. vexans* или передачи вируса кочевыми стадами [182]; орошаемые земли, такие как бассейн и дельта рек Нила или Сенегал, где постоянная вода может способствовать постоянному поддержанию популяции комаров рода *Culex*, и, таким образом, обеспечивая передачу вируса ЛДР круглый год [395;393;205; 453]; умеренных и горных районах на Мадагаскаре,

где передача и распространение вируса, связано с традициями торговли скота [183; 425]. Роль диких жвачных в распространении вируса, которая считается основной в южной части Африки, нуждается в дальнейшем исследовании [435]. ЛДР исторически не ограничивается африканским континентом. Известно, что движение животных, законным или незаконным путем, вносит весомый вклад в распространение вируса [95; 572; 171; 176]. Зараженные комары могут быть перенесены в самолете или грузовыми судами [495].

Еще одним из способов распространения вируса в зонах циркуляции вирулентного вируса является повторное использование игл во время кампании по вакцинации животных [194]. Разработка и применение без игольного метода введения препарата было бы идеальным в данной ситуации, обеспечивая безопасность для ветеринарного врача и животного-реципиента [348].

Беспрецедентное увеличение международной торговли, передвижение людей, животных и продуктов животного происхождения по всему миру также способствуют распространению ЛДР. Во время последних вспышек ЛДР в Мавритании 2010-2012 гг. и на о. Мадагаскар 2006-2007 гг. отмечали высокий процент вовлечения в эпизоотический процесс верблюдов и КРС [171; 302; 163].

Из-за незаконного ввоза жвачных животных и короткого географического расстояния между южными берегами Европы и Северной Африки, взаимодействие стран Средиземноморского бассейна и Европы увеличивает угрозу появления ЛДР в этих регионах. В 2010 и 2012 гг. вспышки в Мавритании и Сенегале [222; 614; 623], связаны с обнаружением серологически позитивных верблюдов в Марокко, поступающие из южной части пустыни Сахара в северо-западном направлении [221]. Rolin A.I. (2013) Turell M.J. (2008) не исключают появление ЛДР в Европе и Северной Америке [574; 488; 490].

Как отмечалось и экспериментально показано, что вирус ЛДР сохраняет свою инфекционную активность в течение длительного периода: вирус может

быть выделен из паренхиматозных органов, таких как селезенка или печень даже через 36 и 72 часов после смерти; в плазме инфицированных овец вирус сохраняет инфекционность после 8 лет хранения в условиях низких температур [216; 217; 142; 272]. Следовательно, ветеринарные врачи и лабораторный персонал, сельскохозяйственные и работники скотобоен представляют группу риска [455]. В сыром молоке вирус выявляется на низком уровне. Наличие вируса в носовых и слезные выделениях, в моче и фекалиях зараженных животных не было продемонстрировано [454; 220]. На сегодняшний день, передачи ЛДР от человека к человеку не зарегистрировано.

Хотя, в большинстве случаев заболевания людей, ЛДР вызывает легкое заболевание с лихорадкой, головной и мышечной болью, заболевание людей может привести к осложнениям в виде ретинита с постоянной потерей зрения, невоспалительному энцефалиту [249; 306], геморрагические формы болезни могут привести к смерти [339]. У взрослых можно наблюдать неспецифические признаки, такие как рвота, диарея, гриппоподобный синдром, лихорадка, вялость, и анорексия. Однако во время вспышки 2000 г.в Саудовской Аравии, основные клинические признаки, зарегистрированные среди 165 исследованных пациентов, включали высокую частоту (75%) гепатоцеллюлярной недостаточности, острой почечной недостаточности у 42 % пациентов и геморрагические проявления составляющие около 19 % . В общей сложности смертность среди пациентов составила 33,9% [106].

Эти и другие примеры позволяют утверждать, что особо опасные инфекционные болезни по-прежнему представляют устойчивую глобальную угрозу для продуктивности сельского хозяйства, здоровья животных и человека. Изучение молекулярно-биологических свойств, полипептидного состава, спектра структурных и неструктурных компонентов вируса, их функциональной активности и диагностической значимости является основой для совершенствования существующих и создания новых современных методов диагностики и средств профилактики.

2.2.4. Реассортация РНК содержащих вирусов, имеющих сегментативным геномом

В клетках инфицированных двумя родственными вирусами внутри каждого семейства может происходить обмен сегментами с образованием жизнеспособных стабильных реассортантов. Они встречаются в природе и являются важным источником генетической variability возбудителя [31;148; 163; 228; 264;517; 368; 498;500; 532; 549; 589].

При одновременном заражении клетки двумя разными штаммами сегменты реплицирующихся геномов смешиваются в любом (произвольном) сочетании. Поэтому новые вирионы содержат разные наборы генов, заимствованные от каждого из исходных вирусов. Такое комбинирование сегментов вирусной РНК называется генетической реассортацией. Она является формой генетической рекомбинации, наблюдаемой у РНК-вирусов с сегментативным геномом и обнаружена у семейств с 2 (арена- и бирнавирусы); 3 (буньявирусы); 6-8 (ортомиксовирусы); 10-12 (реовирусы) геномными сегментами [207; 221; 427; 453; 574; 580].

Несмотря на то, что вирусы гриппа А выделены от широкого круга - хозяев, включая людей, свиней, лошадей, собак, морских млекопитающих, домашних птиц, естественным природным резервуаром вируса гриппа А являются дикие птицы. Длительное существование вируса гриппа А в ареале обитания его естественных хозяев привело к устойчивости системы вирус-хозяин в биосфере [549]. Вирус, вызвавший самую опустошительную эпидемию гриппа в 1918 г., как показали исследования Taubenberger J.K. et al, (2007) не являлся реассортантом между вирусом гриппа птиц и вирусом гриппа человека. Все 8 генов вируса H1N1 имели сходство с вирусом гриппа птиц, нежели человека.

Между тем, в процессе эволюции периодически возникают новые высокопатогенные для человека и животных варианты вируса.

Подтверждением этому служат документированные случаи инфицирования человека и домашних животных высокопатогенными вирусами гриппа птиц А-потипов H9, H7, H5, H1 (грипп свиней) [614; WHO, OIE, FAO, 2011]. Кроме того, для вируса гриппа А, возможна генетическая межвидовая рекомбинация – грипп птиц/грипп свиней/грипп человека в результате одновременного инфицирования клетки [424; 453].

Подобная ситуация наблюдалась при возникновении пандемий гриппа в XX и XXI веках, в том числе 2009 года. Вирус гриппа А/H1N1, вызвавший первую пандемию гриппа в XXI веке, филогенетически происходит от вариантов вируса гриппа свиней и птиц. В 2014 году в Юго-Восточной Азии выделены реассортантные высокопатогенные изоляты вируса гриппа птиц подтипа H5, имеющие антигенную формулу H5N8 (Ю. Корея) и H5N6 (Лаос) [610].

Реассортация также характерна для вирусов семейства *Bunyaviridae*. Overby (2007) и другими исследователями было показано, цитоплазматический хвост гликопротеинов Gc, Gn играет важную роль при упаковке генома буньявирусов [500; 442; 255]. Кроме того на N-участке нуклеопротеина имеются важные области для связывания с гликопротеинами вируса. Таким образом, в результате ко-инфекции организмов москитов вирусами одного рода возможна реассортация сегментов и возникновение новых вирусов. Идеальной ареной для реассортации вируса гриппа являются свиньи, имеющие рецепторы и для вируса гриппа А, и гриппа птиц; для вируса ЛДР рода москитных лихорадок – членистоногие переносчики, так как вирусная инфекция у москитов не носит литического характера [129; 148; 234; 396; 400; 403; 243; 575]. К тому же высокая частота мутаций вирусной РНК полимеразы может привести к антигенному дрейфу и обмену сегментов генома близкородственных вирусов при ко-инфекции, что может привести к антигенной изменчивости вируса [163; 556; 600].

Реассортаты вирусов семейства *Bunyaviridae* выделены в природе, что свидетельствует о способности оболочечных гликопротеинов, кодируемых М-сегментом, взаимодействовать с гетерологичным RNP при ко-инфицировании двумя вирусами [163; 304; 451; 434; 324; 565; 574].

Так в Сенегале во время вспышки ЛДР выделенные изоляты оказались реассортантами полевого вируса и вакцинного штамма. Также в пробе от пациента была выявлена ко-инфекция вакцинного штамма Smithburn's и полевого вируса [231; 230; 138]. Morrill J.C. с соавторами (2010) показали, что штамм ZH-501 состоит из 2 субпопуляций, имеющих в положении 847 п.н. М-сегмента одну замену остатка глутаминовой кислоты на глицин, что привело к снижению вирулентности штамма для мышей, однако при ко-инфекции с вирулентным вирусом происходит восстановление вирулентности в течение 1-2 пассажей [421]. В Южной Африке во время эпизоотии ЛДР 2010 г. идентифицировали новый генотип вируса, который не был связан с изолятами, выделенными в 2008 и 2009 гг. и относящимися к двум различным сублиниям.

2.3. Диагностика особо опасных инфекций

Экстренная и надежная диагностика особо опасных инфекционных болезней (грипп и болезнь Ньюкасла) в том числе экзотических (ЛДР) является одним из неперенных условий борьбы с ними. Ценность методов лабораторной диагностики определяется их чувствительностью, специфичностью и временем постановки реакции при обнаружении специфических антигенов и антител непосредственно в пробах.

Для диагностики указанных болезней в настоящее время в нашей стране широко используются тест-системы в большинстве импортного производства фирм IDVET, LSI (Франция), IDEXX (США). Ликвидация технологического отставания ветеринарной медицины является основой обеспечения национальной безопасности, технологического суверенитета и социально-экономической независимости страны.

2.3.1. Диагностика гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Для диагностики гриппа птиц в нашей стране используются: диагностикум на основе РТГА для типирования вируса гриппа Покровского комбината биопрепаратов; диагностикум для выявления антител к вирусу гриппа Н5 на основе РТГА ФГБУ ВНИИЗЖ; набор для выявления антител непрямым ТФ ИФА ОАО «Авивак» Ленинградской области; набор для выявления антител непрямым ТФ ИФА ФГБУ ВНИИЗЖ. В свое время для дифференциальной диагностики болезни Ньюкасла разработан метод на основе РТГА и избирательной чувствительности гемагглютиниона к действию азотистой кислоты. Разработан унифицированный метод изготовления диагностикумов и инаktivированных вакцин из полевых штаммов вирусов болезни Ньюкасла и гриппа птиц [70]. На основе ОТ-ПЦР разработаны тест системы для выявления нейраминидазы N1 и гемагглютиниона Н5 вируса гриппа птиц; генома вируса болезни Ньюкасла [16; 52; 363; 366].

В настоящее время для выявления антител к вирусу НБ в крови домашних и диких птиц широко используют реакцию торможения гемагглютинации (РТГА). Наряду с РТГА также используют различные варианты иммуноферментного анализа. Достоинствами этого метода являются экспрессность, возможность стандартизации условий постановки реакции. Коммерческие иммуноферментные наборы для выявления антител к вирусу НБ, в основном, основаны на непрямом варианте ИФА и предназначены для исследования сывороток крови кур и индеек. Пантюшенко М.С. разработана тест-система для ПЦР-диагностики НБ

2.3.2. Диагностика лихорадки долины Рифт

Подозрение на ЛДР связано с наличием внезапных массовых аборт, почти 100% гибели молодняка до 14 суточного возраста или наличием гриппоподобного (лихорадочного) синдрома у людей.

Постановка диагноза на основе только клинических признаков болезни сложна или зачастую невозможна без проведения лабораторной диагностики. Схема соответствующих лабораторных исследований находится в

зависимости от эпидемиологического статуса области, а также времени после заражения. Диагностика осуществляется либо обнаружением живого вируса, вирусного антигена, либо вирусной нуклеиновой кислоты в течение 1-10 дней после начала заболевания [4; 29; 62; 393; 140; 419; 200; 216; 217; 293], либо путем выявления антител острой фазы (IgM) или хронического течения (IgG), начиная с 4 дня после инфицирования [66; 67; 92; 501; 147; 450].

В подавляющем большинстве для выявления генома вируса ЛДР методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ ПЦР) используются олигонуклеотидные праймеры, комплементарные S-сегменту геномной РНК. Данный метод позволяет в кратчайшие сроки (в течение 1 рабочего дня) с большой степенью специфичности проанализировать большое количество биоматериала. В странах Южной и Юго-Восточной Африки (Кения, Уганда, ЮАР), где случаи заболевания лихорадкой долины Рифт довольно часты, диагноз может быть поставлен только лишь на основании выявления генома вируса методом ОТ ПЦР. В случае первичного возникновения заболевания на территории других стран необходимо провести также вирусовыделение с идентификацией возбудителя серологическими методами [613; 614; 617; 618].

За рубежом и у нас в стране [7; 29; 62;] разработаны тест – системы для выявления генома вируса ЛДР методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Кроме того, в базе данных генетической информации (GenBank) депонировано большое количество полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов различных штаммов и изолятов вируса ЛДР. Кроме того разработаны ОТ ПЦР в режиме реального времени с изотермическим усилением анализа (PT-LAMP), позволяя обнаружить широкий спектр штаммов в клинических образцах в течение 30 мин [305; 245; 353; 422; 432; 441; 501]. Применение ПЦР-диагностики — высокоэффективного метода определения вирусов с высокой антигенной изменчивостью, возможно выявление фрагмента возбудителя не только в материале от животного, но и в объектах окружающей среды (почва, вода и т.д.). Существенным недостатком данной

реакции является ее дороговизна; ограничение срока применения коротким периодом вiremii; осуществляется только в лабораторных условиях при наличии соответствующего оборудования.

К тому же следует учитывать, что обнаружение генетического материала возбудителя служит лишь свидетельством инфицирования, но не наличия инфекционного процесса. То есть эти методы не являются безусловным доказательством его этиологической значимости в патологическом процессе, и для постановки точного диагноза требуется применение дополнительных вирусологических методов и методов иммуноанализа.

Различные классические серологические методы разработаны для выявления специфических антигенов и антител к ЛДР. Реакция торможения гемагглютинации и РСК, но в этих реакциях члены рода москитных лихорадок обнаруживали высокую перекрестную реактивность, что затрудняет их дифференциацию [537; 557]. Реакция нейтрализации вируса считается эталоном в диагностике ЛДР, является высокоточной реакцией, в ней нет или мало перекрестных реакций с другими представителями рода *Phleboviruses* [557; 568]. Однако эта методика небезопасна и требует применение живого вируса, и, следовательно, может использоваться только в лаборатории с уровнем биобезопасности 3 категории [450; 52; 123; 230; 290].

Иммунофлуоресцентный метод выявления антигена и антител менее чувствительный, чем РН и ТФ ИФА, однако он часто применяется для диагностики ЛДР [7; 92; 230; 297; 518; 537].

Ранние методы ИФА были основаны на применении очищенного антигена вируса и поликлональных антител [429; 449; 450]. В отечественной диагностике ЛДР разработаны различные форматы ТФ ИФА: для обнаружения специфических антител класса IgG метод ингибирования ИФА, непрямой ТФ ИФА на основе поли- и моноклональных антител с использованием в качестве специфического вирусный частично очищенный антиген [27; 66; 67; 92]; захватывающий ТФ ИФА для выявления антител

класса IgM и IgG в сыворотках крови крупного рогатого скота, коз и овец [449]. Во ВНИИВВиМ Россельхозакадемии разработана методика твердофазного иммуноферментного анализа, на основе МКА и вирусного антигена, позволяющая обнаруживать вирус ЛДР в различных образцах биологического материала (пробах органов, культурах клеток, крови) [27].

Для повышения безопасности проведения исследований и увеличения чувствительности и специфичности методов за рубежом разработаны ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков вируса ЛДР [393; 297]. Среди недавно разработанных и подтверждённых тестов для обнаружения антигена методом сэндвич ИФА (SAG-ИФА) [297; 446] имеет 67,7 % и 70% чувствительность; 97,9% и 100 % специфичность для человека и овец, соответственно.

Белок нуклеокапсида является иммунодоминантным вирусным белком, и характеризуется высоким консерватизмом среди членов семейства буньявирусов [157;241;249; 258; 479; 557].

В реакции нейтрализации и различных форматах ИФА выявляются антитела, взаимодействующие с эпитопами вирусного антигена. В ИФА обнаруживаются паратопы антител ко всем специфическим компонентам вируса и, следовательно, он является более чувствительным, чем тест нейтрализации вируса, который обнаруживает только антитела к вирусным нейтрализующим эпитопам. J. van Vuren соавт. (300) было показано, что IgG I-ELISA на основе рекомбинантного NP был более чувствителен, чем РН при обнаружении антител вначале иммунного ответа у овец, экспериментально зараженных диким типом ЛДР и у овец, иммунизированных живой ослабленной вакциной из штамма Smithburn's [298].

2.4. Использование рекомбинантных белков в качестве специфических антигенов

Эффективность борьбы с любым заболеванием определяется его точной диагностикой на раннем этапе развития болезни. Одним из методов диагностики инфекционных болезней являются методы, основанные на детекции специфических антител. В них в качестве специфического антигена используется нативный или инактивированный культуральный, мозговой или

эмбриональный фиксированный антиген [87; 68; 27; 86; 21; 23; 40; 56; 58]. Получение подобного препарата является весьма трудоемкой и опасной процедурой, так как качество выхода специфического антигена зависит от используемого штамма, субстрата, на котором получен антиген (чувствительная культура клеток, развивающиеся эмбрионы кур (РЭК), мозг мышей), что приводит к различиям в относительном содержании иммунореактивных протеинов. Такой нестандартный антиген затрудняет интерпретацию результатов, особенно при исследовании сывороток с низким содержанием антител [56; 36].

Альтернативой традиционному получению антигена может стать рекомбинантный вирусный белок, синтезированный в про- или эукариотической системе экспрессии [58; 59; 63; 301; 297; 537; 362; 230]. При наличии эффективных штаммов-продуцентов получение рекомбинантного белка потребует значительно меньше времени. Использование рекомбинантных антигенов в качестве реагентов также позволяет совершенствовать иммунодиагностику. Важно заметить, что этот подход позволяет фактически исключить использование высокопатогенных инфекционных агентов при производстве тест систем. Другим важнейшим преимуществом данных технологий является возможность стандартизации качества и обеспечения производства иммунодиагностических тест-систем необходимыми биологическими компонентами (антителами и антигенами) в течение неопределенно длительного времени [37; 58; 75; 123; 316; 317].

2.5. Гибридная технология и применение моноклональных антител

Изучение взаимодействия моноклональных антител с вирусными белками, а также с их рекомбинантными аналогами позволяет идентифицировать наиболее важные структурные домены вирусных белков, выявить особенности строения вирионов, получить новую информацию о патогенезе болезни и механизмах противовирусного иммунитета [146; 132; 134; 390; 189; 87; 90]. Поверхностные белки и нуклеопротеин практически

всех вирусов являются иммунодоминантными и поэтому используются при разработке диагностических тест-систем и средств специфической профилактики [93; 133; 515; 351; 225; 226]

Опубликование в 1975 году статей, в которых описана методика слияния нормальных плазмочитов с их опухолевыми аналогами - клетками миеломы и последующий отбор клонов-продуцентов антител [1, 10, 117; 23], открыло эру создания, исследования и использования МКА. Совокупность приемов получения штаммов-продуцентов МКА была названа гибридной технологией. В ее основе лежит клональная теория Бернета и синтез ряда достижений клеточной биологии, фундаментальной иммунологии и экспериментальной онкологии. Моноклональные антитела последние 20-30 лет являются мощным бесценным инструментом исследования биологических макромолекул, который помогает расширить наши знания биологических систем. В настоящее время МКА применяются в повседневной практике научных лабораторий, активно используются для конструирования и производства высокоспецифичных тест-систем и все шире применяются в практической медицине. Препараты очищенных МКА служат основой ИФА тест-систем для диагностики самостоятельно или как подтверждающий тест ПЦР-диагностики [1; 21; 3; 30].

Гибридная технология позволяет создавать уникальную биотехнологическую базу в виде препаратов МКА для конструирования тестов иммуноанализа с целью исследования вирусных и бактериальных патогенов, опухолевых маркеров, гормонов, цитокинов, интерлейкинов, прионов, токсинов, аллергенов, также разработки терапевтических средств [1; 10; 19; 23; 58; 81; 88; 554; 581; 93].

Ее перспективность была высоко оценена исследователями. Однако при внедрении гибридной технологии в широкую практику стало ясно, что на каждом этапе получения МКА имеются многочисленные технические проблемы, требующие усовершенствования с целью получения желаемого результата в целом [89; 8; 21; 63; 78].

Одна из задач получения МКА связана с отработкой оптимальной схемы иммунизации. Назначение процесса иммунизации состоит в том, чтобы увеличить долю В-клеток и перевести их в функциональное состояние, при котором они способны сливаться и образовывать антителопродуцирующие гибридные клетки, так как клетками-партнерами слияния в основном являются миеломные линии клеток NSO, NSI, X63Ag8.653 и SP-2/0-Agl4. [1; 8]. Для иммунизации почти повсеместно используют мышей линии BALB/с, от которых происходят миеломные штаммы-партнеры [248; 298; 314; 458].

Для получения высокого титра специфических антител необходимо оптимизировать схему иммунизации, так как с увеличением длительности стимуляции антигеном увеличивается аффинность, получаемых моноклональных антител, но снижается олигоклональность иммунного ответа (происходит ответ только на доминантные эпитопы). А частые повторные введения антигена ведут к снижению ответа до фонового уровня [123].

Процесс скринирования антителопродукции клонами гибридом занимает ключевое место в гибридной технологии [32; 37; 22; 328]. Основная потеря хромосом гибридами происходит в течение первого месяца после слияния, затем в процессе длительного культивирования отмечается постепенная сегрегация хромосом [465]. Клонирование является трудоемким и длительным методом получения стабильных гибридных штаммов. Хотя в настоящее время применение проточных цитофлуориметров значительно облегчило данный процесс [146; 458].

Многие исследователи изыскивают методы и способы гибридизации, чтобы повысить частоту образования гибридов, особенно в отношении слабых иммуногенов. Увеличение частоты образования гибридных клеток пытались решить, изменяя концентрацию ПЭГ, значения pH во время слияния, соотношение селезеночных и миеломных клеток, используя различные партии сывороток и типы питательной среды, тимоциты и другие подкормки, а также разные варианты посева слившихся клеток [93; 90; 257; 465; 567]. Однако до настоящего времени ни одна из вышеперечисленных попыток, не привела к

существенному повышению абсолютного выхода получаемых гибридов на иммунизированную селезенку. В работах Хаитова Р.М. с соавторами (1987) и ряда зарубежных авторов описаны различные процедуры гибридизации. Тем не менее, вопрос о преимуществах той или иной модификации остается открытым. Слияние миеломных клеток с иммунными лимфоцитами проводят, как правило, в присутствии ПЭГ, хотя более широко в настоящее время применяется метод электропорации [591; 248; 465; 629].

Базовый протокол создания МКА, разработанный на основе опыта в 80-е годы, в настоящее время остается наиболее широко применимым. Дальнейшее развитие гибридомной технологии связано с применением методов генной инженерии. Использование достижений генной инженерии при получении МКА находят все большее применение [478; 510; 543; 567].

Для получения МКА против молекул с известной первичной структурой в качестве иммуногена вместо природных молекул все шире стали использовать синтетические пептиды [23;26; 316; 317; 357]. Применение такого приема позволило с большей эффективностью получать МКА против определенных антигенных участков интересующих белков [298]. В то же время реагенты, полученные в результате иммунизации синтетическими пептидами и рекомбинантными белками, полученными *in vitro* в бактериях, далеко не всегда способны распознавать нативные молекулы протеинов, что, вероятно, связано с различиями в конформации синтетического пептида и нативной молекулы той же аминокислотной последовательности [53; 241; 357; 363; 522; 523].

В настоящее время все чаще стали применять для получения доноров иммунных спленоцитов и, соответственно МКА направленной специфичности рекомбинантные плазмиды. Принцип метода ДНК-иммунизации заключается во введении рекомбинантной ДНК, кодирующей полноразмерный ген (или его фрагмент) интересующего протеина (антигена). ДНК обеспечивает экспрессию *in vivo* гена искомого антигена и, соответственно, индуцирует иммунный ответ [590; 315]. Однако основная масса публикаций отечественной

и зарубежной литературы относительно применения стратегии ДНК-иммунизации посвящена получению вакцинных препаратов и изучению их протективных свойств [229; 621; 484; 213]. Цели этих исследований, совпадают с таковыми гибридной технологии - получение полноценного гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета. Достижения в области создания вакцин нового поколения могут быть с успехом использованы в гибридной технологии и наоборот.

Системы скрининга гибридом, так же как и в прошлые десятилетия опираются преимущественно на варианты иммуноферментного анализа. В зависимости от природы антигена и целей создания МКА используют твердофазный ИФА в планшетном варианте, или «дот»-анализ. Антитела против клеточных антигенов выявляют в ИФА на иммобилизованных на планшетах клетках, или на проточных анализаторах, применяя флуоресцирующие метки. Новой по формату исполнения и чрезвычайно экономичной в отношении времени и реагентов стала техника с применением микрочипов [39; 392; 338; 433; 570]. Для проведения иммунологического анализа применяют белковые микрочипы или иммуночипы. У микрочипов белки адсорбированы или ковалентно связаны с подложкой и непосредственно контактируют с исследуемым материалом, что существенно сокращает время анализа и упрощает технологию изготовления микрочипа, а ковалентная связь обеспечивает прочное связывание белков с поверхностью подложки [606]. Основным ограничением в ее распространении пока является отсутствие соответствующей дорогостоящей аппаратуры.

2.6. Противовирусный и поствакцинальный иммунитет.

Иммунитет против вирусных болезней в основном зависит от индукции ответа к вирусным антигенам. Главная его цель – нейтрализация вируса, разрушение и элиминация зараженных клеток, продуцирующих вирус.

Современная вакцинология основывается на изучении клеточных и молекулярных механизмов развития специфического иммунного ответа организма, определяемого активностью взаимодействия иммунокомпетентных

клеток, накоплением антителопродуцирующих клеток и антител. Часть из накопившихся в организме Т- и В-лимфоцитов антиген-специфических клонов превращаются в малые лимфоциты, носители иммунологической памяти [34; 60; 94]. Лимфоциты специализированы по функциям. В-лимфоциты продуцируют антитела. Цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK) уничтожают клетки, инфицированные вирусом. Т-хелперы координируют иммунный ответ путем контактных межклеточных взаимодействий и выделения в межклеточную среду цитокинов, регулирующих развитие клеточного и гуморального иммунного ответа. Их определение дает дополнительное представление о состоянии иммунной системы [41; 55; 79].

Синтезируемые антитела попадают в кровь и взаимодействуют с патогеном. Они опсонизируют патоген, подготавливая его к фагоцитозу; активируют систему комплемента, которая способствует фагоцитозу и уничтожению возбудителя. Антитела способны нейтрализовать вирус, связываясь со специфическими структурами на поверхности вируса и ингибируют взаимодействие рецептор-вирус, предотвращая заражение клетки [477]. Тесное временное отношение сывороточных нейтрализующих антител и элиминации вируса предполагает, что ВН антитела играют ключевую роль в контроле инфекции [74; 407; 410; 104; 108]. Нейтрализующие антитела считаются основным механизмом предотвращения повторного заражения вакцинированных и выздоравливающих хозяев. Хотя N белок является одним из основных иммуногенов и индуцирует сильный антительный ответ, анти-Nантитела не обладают вируснейтрализующими свойствами. Они способны в 40-60% случаев предотвратить инфекцию большинством вирусов, в том числе ЛДР [446] и обеспечивает гетеросубтипический иммунитет при гриппе А [44; 69].

Вирусная инфекция приводит к быстрой активации врожденного иммунного ответа хозяина, который связан с кратковременным ограничением репликации вируса. Система интерферонов (ИФН) является чрезвычайно

мощным противовирусным ответом, который способен контролировать большинство, если не все, вирусные инфекции в отсутствие адаптивного иммунитета. Одним из основных компонентов врожденного противовирусного ответа являются интерфероны (ИФН) I типа, группа близкородственных цитокинов. Через общий рецептор они активируют более 400 так называемых ИФН-стимулированных генов, или ISGs. [460; 474]. Многие из них обладают антивирусной активностью, и, таким образом ограничивают распространение вируса, стимулируя клеточную резистентность, делая клетки непригодными для размножения вирусов [408; 185; 474]. В дополнение к клеточно-автономной деятельности, IFN- α/β модулируют иммунную систему, активизируя функцию эффекторных клеток, и способствуют развитию приобретенного иммунного ответа.

Индукцию синтеза ИФН- α/β вызывает распознавание комплекса PAMPs (патогенассоциированных маркерных структур микроорганизмов), которые являются лигандами для TOLL-подобных и других паттерн распознающих рецепторов (PRRs), инициирующих каскад реакций врожденного и адаптивного иммунитета [561; 541], имея большое значение в посредничестве индукции ИФН I типа РНК-содержащими вирусами [354; 378; 555; 509; 445].

Под влиянием ИФН- α/β развивается каскад реакций способствующих фрагментации односпиральной иРНК, нарушению РНК-транскрипции, что обуславливает прекращение синтеза белков и приводит к деградации вирусной РНК [237; 433; 504].

Чтобы выжить в природе вирусы выработали стратегию уклонения от иммунной системы организма [474]. Молекулярные механизмы, с помощью которых это достигается варьирует в зависимости от различных вирусов [173; 233; 252; 471]. Природа антагонистов ИФН, кодируемых вирусами отрицательной смысловой РНК отражает эти процессы. Так, например, белок NSs *Bunyavirus* (BUNV) ингибирует клеточную транскрипцию, тем самым блокируя производство ИФН и способность инфицированных клеток реагировать на ИФН (569); белок NS1 вирусов гриппа (FLUAV) является

многофункциональным белком, который специфически ингибирует активацию RIG-I, как правило, препятствует правильной обработке и экспорту клеточных мРНК из ядра в цитоплазму (265). ИФН антагонисты парамиксовирусов блокируют индукцию и сигнальную систему ИФН. Таким образом, индуцирование синтеза ИФН 1 типа можно считать потенциальным терапевтическим и профилактическим подходом в борьбе с вирусными болезнями [175].

2.6.1. Особенности иммунного ответа при ДНК-иммунизации

Генно-инженерные вакцины, как и классические живые вакцины, относительно просты в производстве, технологичны, относительно не дороги, репродуцируются в организме иммунизируемого животного, создавая мощный антигенный стимул [13; 51; 72; 76; 195]. При этом генно-инженерные вакцины обладают преимуществами инактивированных вакцин: отсутствие реверсии, экологическая безопасность и простота процедур технологического контроля. Кроме того, генно-инженерные вакцины обладают свойством, которого нет у классических вакцин обоих типов. Оно заключается в том, что такая вакцина изначально является генетически маркированной [135; 227].

Как и живые аттенуированные, ДНК-вакцины способны обеспечивать иммунитет в течение длительного времени. Имитируя вирусную инфекцию и не являясь таковой в действительности, инициируют развитие полноценного, преимущественно опосредованного Т-клетками иммунного ответа [335; 437; 170]. Применение гетерогенной системы праймирования и бустирования с использованием различных векторов доставки одного и того же иммуногена стимулирует как Т-клеточное, так и гуморальное звено иммунного ответа. [282]. При этом многими авторами показано, что использование ДНК-вакцин при праймировании является перспективным и целесообразным методом [344; 350; 407; 444; 564].

Механизм иммунного ответа на введение рекомбинантных ДНК до конца не изучен. Считается, что она индуцирует сильный ответ Т-хелперов типа 1 (Th1), в отличие от Th2-типа после иммунизации обычным белком

[406; 407; 150; 135]. Синтез закодированного в плазмиде белка *in vivo* обеспечивает его дальнейший процессинг для презентации в комплексе с антигенами МНС I и II классов иммунокомпетентным клеткам. В присутствии соответствующих ко-стимулирующих молекул, экспрессируемых антигенпрезентирующими клетками происходит активация иммунокомпетентных клеток, обеспечивая, таким образом, развитие клеточного и гуморального ответа, имитирующего иммунный ответ на инфекционный агент и синтез репертуара антител, подобного сывороточному. Бактериальная ДНК обладает иммуностимулирующим действием, направленным на активацию В-лимфоцитов, а так же наличие в плазмиде неметилованных CpG мотивов сопровождается активацией естественных киллеров (NK), дендритных клеток, макрофагов и В-клеток. [564; 333; 607; 314; 318; 329; 335].

Клетки организма, по крайней мере, вначале, в месте инъекции трансформируются плазмидой, ДНК транспортируется к ядру, где транслируется интересующий (репортерный) белок. Экспрессия репортерных генов обнаружена в мышцах, селезенке, печени, коже, легких и мозге. Механизм интернализации ДНК клетками еще не выяснен и неизвестно, почему мышечные клетки являются наиболее эффективной клеточной мишенью трансфекции при прямом введении ДНК [126; 116].

Особенность ДНК-иммунизации состоит в ее эффективности, даже в присутствии материнских антител, к тому же используя один и тот же вектор, можно конструировать вакцины на основе фрагментов ДНК различных штаммов возбудителей в качестве поливалентных защитных препаратов; [542; 28; 37; 344; 332].

Доставка плазмидной ДНК со встроенными репортерными генами осуществляется путем внутримышечного, интраназального или внутрикожного введения. Этот подход обладает преимуществом, состоящим в нацеливании ДНК на широкий ряд антиген-презентирующих клеток. Однако в индукции иммунного ответа эффективно участвует лишь 0,1-0,2% плазмидной

ДНК, а большая ее часть быстро разрушается. Поэтому для иммунизации животных требуется значительное количество нуклеиновой кислоты. Так, например, для индукции иммунного ответа при внутримышечном введении на мышь требуется не менее 50 мкг плазмидной ДНК, а при балистическом в 10 раз меньше [13; 42; 59; 51; 74].

Наиболее перспективным приемом, позволяющим расширить возможности ДНК-вакцинации, является включение ДНК в липосомы или биodeградируемые микросферы, которые обеспечивают защиту ДНК и позволяют проводить сочетанную инъекцию плазмидной ДНК и генетических адъювантов, многократно усиливая иммунный ответ [3; 5; 434; 224]. Несмотря на быстрые темпы развития этого направления, остается недостаточно изученным широкий круг вопросов касающихся вероятности хромосомной интеграции и механизмов индукции иммунного ответа при ДНК-вакцинации [32; 83]. Иммунный ответ на ДНК-вакцины можно улучшить путем одновременного введения общепринятых адъювантов, иммуностимуляторов, таких как последовательности структуры CpG; плазмид, экспрессирующих цитокины; костимуляторные молекулы. Поэтому при конструировании ДНК-вакцин с целью повышения их иммуногенности подбирают соответствующие адъюванты и оценивают эффективность их применения [578; 202].

Митрофанова Е.Э. и соавт. разработали конструкцию плазмидного вектора для иммунизации животных против вируса клещевого энцефалита. Вектор включает ген гликопротеина оболочки вириона и ген неструктурного гликопротеина NS1, который находится на поверхности клеток, инфицированных вирусом клещевого энцефалита (ВЭК). Защитный эффект ДНК-иммунизации исследовали на мышах линии BALB/c. Животные, иммунизированные ДНК-вакциной, оставались здоровыми в течение всего срока наблюдения после заражения вирулентным вирусом [42].

Davis H.L. et al. (1999) при изучении длительности иммунного ответа обнаружили, что после ДНК-иммунизации мышей геном поверхностного антигена вируса гепатита В, уровень антител выходит на плато на 104 сут и

остается стабильным 18 мес. Бустерная иммунизация через 7 мес увеличивала количество антител более чем в 10 раз [199].

2.7. Методы повышения иммуногенности вакцинных препаратов

Для усиления индукции продолжительного протективного иммунитета индуцируемого, как традиционными (за исключением живых аттенуированных), так и генно-инженерными вакцинами используются адъюванты. В вакцине, специфичность иммунного ответа обеспечивается антигеном, а роль адъюванта сводится к стимулированию местной реакции и усилению системного иммунного ответа [189; 426]. Они способны генерировать развитие сильного иммунного ответа, что снижает количество антигена, необходимого для иммунизирующей дозы вакцины [131; 193]

В последние годы все больший акцент делается на создание адъювантов, обладающих иммуномодулирующими свойствами. Этот подход дает возможность дифференцированно стимулировать гуморальные или клеточные механизмы иммунного ответа на вакцинные препараты [543; 544; 154]. Поэтому при конструировании образцов ДНК-вакцин с целью повышения их иммуногенности подбирают соответствующие синтетические, генетические адъюванты и оценивают эффективность их применения при ДНК-вакцинации.

Традиционно наиболее широко используемыми адъювантами при производстве инактивированных вакцин для животных являются минеральные масла и гидроокись алюминия [269; 386; 509;]. Согласно ранее существовавшим представлениям, роль адъювантов сводилась только к удержанию антигена на месте введения. В настоящее время установлено, адъюванты взаимодействуют с антигенпрезентирующими клетками, эффекторными клетками, Т-хелперами и клетками воспаления [193; 347; 349; 543; 290; 66]. Высокое содержание фосфатов на молекуле ДНК дает высокую аффинность связывания нуклеотида на гидроокиси алюминия, который в свою очередь предохраняет ДНК (РНК) от воздействия протеаз. Алюминиевые адъюванты доказали свою эффективность применения в вакцинологии.

Также разрабатываются новые адъюванты, которые по существу являются естественными лигандами или синтетическими агонистами для патогенраспознающих рецепторов (PRRs), действуют путем индукции врожденного иммунитета. В ряде работ был продемонстрирован выраженный иммуностимулирующий эффект бактериальной ДНК. Ее активность связана с наличием неметилированных CpG динуклеотидов и может имитироваться синтетическими CpG олигодезоксинуклеотидами. (CpG ОДН)[38, 243, 310, 506]. Они распознаются Толл-подобными рецепторами TLR-9 и инициируют сигнальный каскад реакций, приводящий к синтезу провоспалительных цитокинов и активации системы врожденного и адаптивного иммунитета [116, 337]. Несмотря на широкое использование адъювантов в вакцинах для человека и животных, механизмы действия их не достаточно охарактеризованы. Последние достижения в области иммунобиологических исследований показали несколько механизмов, с помощью которых действуют адъюванты. 1) Некоторые адъюванты, предположительно образуют депо на месте инъекции, что связано с медленным высвобождением антигена; 2) другие адъюванты, связаны с транзиторной секрецией цитокинов и хемокинов; 3) секретируемые цитокины и хемокины участвуют в привлечении к месту инъекции различных иммунных клеток, которые в свою очередь секретируют цитокины и хемокины, привлекая другие иммунные клетки. Все эти события приводят к формированию локальной иммунной среды в месте инъекции. 4) привлеченные APC экспрессируют различные PRRs как на поверхности (TLRs, Clrs), так и внутриклеточно (NLRs и RLRs), которые распознаются и/или активируются адъювантами. 5) Это приводит к созреванию и активации АПК. Зрелые APC регулируют экспрессию MHC и коstimуляторных молекул 6) и характеризуются повышенной способностью к процессингу антигена и его презентации. 7) мигрируют в дренирующие лимфатические узлы взаимодействуют с антиген-специфическими В или Т-клетками, 8) активируют секретирующие антитела В-клетки и/или эффекторные CD8 + Т-клетки.

2.8. История создания средств специфической профилактики лихорадки долины Рифт

Важнейшим направлением научных изысканий средств борьбы с инфекционными болезнями остается разработка и совершенствование различных типов вакцин, в том числе нового поколения [49; 287; 144].

Традиционно разработка вакцин основана на получении аттенуированных штаммов вируса, которые могут реплицироваться в организме хозяина, но не вызывает развитие болезни. [65; 69; 561; 578; 502]. Попытка иммунизировать овец и крупный рогатый скот против ЛДР впервые была предпринята 65 лет назад, когда вирулентный штамм вируса был аттенуирован внутримозговыми пассажами на мышах [472; 473]. Нейротропный штамм оказался авирулентным для мышей, обезьян и овец при парентеральном введении, но при внутримозговом введении вызывал гибель животных [308; 309]. На сегодняшний день несколько ветеринарных вакцин находятся на стадии разработки, но лицензированных и коммерчески доступных вакцин для защиты людей нет [287; 495]. Что касается жвачных животных живая аттенуированная вакцина из штамма Smithburn's широко используется в Африке [127; 530]. Она дешево и эффективно защищает овец и крупный рогатый скот после однократного введения, но способна вызывать аборт, обладает тератогенностью и не исключена опасность реверсии вирулентности. Используют данную вакцину для профилактики ЛДР в эндемичных районах [165; 127; 152].

Из всех нынешних кандидатов ЛДР вакцин, штамм MP12 является наиболее детально изученным. Штамм MP12 получен путем 12 последовательных пассажей вируса (изолят ZH548) в присутствии 5-фторурацила [259]. В результате получен ослабленный для мышей [168; 170] и хомяков [415; 414; 533] вирус, который имел в общей сложности 25 нуклеотидных замен, присутствующих в каждом сегменте генома, по сравнению с родительским штаммом [502; 409; 410]. Комплексные испытания

безопасности и эффективности на животных показали, что МР12 безопасен для новорожденных и беременных коров и овец [504; 586; 127; 294; 410; 413-415;]. Другие авторы показали, что МР12 патогенен для белых мышей при парентеральном введении, а также вызывает пороки развития у плодов овец при введении вакцины в течение первого триместра беременности (от 35 до 56 дней) [280; 283; 270; 290]. Новым, перспективным кандидатом для изготовления живой аттенуированной вакцины является клон 13 – мелкобляшечный вариант изолята, выделенного в Центрально-Африканской Республике [215; 416]. Штамм имеет 70% делеций в *nss*-гене, кодирующем неструктурный белок NSs [150; 416], авирулентен для мышей, индуцирует реакцию интерферона в клетках млекопитающих, в отличие от вирулентных штаммов ЛДР [160; 200]. Хотя Vialat P. и др. (2000) сообщали о неврологических расстройствах и параличах у привитых мышей, предполагая, что изолят не является полностью безвредным. Вакцина из этого штамма была недавно зарегистрирована и, с 2008 г. внедрена в Южной Африке для профилактики ЛДР [311; 312; 331; 569]. Однако недавние детальные исследования этого штамма, проведенные в Нидерландах, показали его остаточную нейровирулентность при вакцинации овец, особенно на первом триместре суягности [385].

Антигенные изменения в сочетании с отсутствием репликации делает инаktivированные вакцины против ЛДР менее иммуногенными, чем живые ослабленные препараты вируса. Хотя известно, что инаktivированные вирусные вакцины являются более стабильными, чем ослабленные вирусные вакцины. Общей озабоченностью в отношении использования инаktivированных формалином вакцин является степень и продолжительность вакцин-индуцированных иммунных реакций [74; 81; 83; 459]. Антительные реакции на введение инаktivированной вакцины оказались более длительными, чем ожидалось. У 73% вакцинированных животных после 21 месяцев (630 дней) обнаружены вируснейтрализующие антитела с титрами в диапазоне от 1:20 до 1:180 ТЦД. Также отмечено, что животные,

вакцинированные инаktivированной вакциной имели уровень вируснейтрализующих антител на детектируемом уровне через девять и 12 месяцев после первичной вакцинации [124; 144]. Титры вируснейтрализующих антител у вакцинированных грызунов, овец [265], и резус макак [454] в диапазоне от 1:20 до 1:40, как правило, принято считать защитными против болезни [112; 124; 430].

Разработка вакцин нового поколения. С начала 90-х годов прошлого века научные лаборатории за рубежом начали активно работать в направлении создания субъединичных, рекомбинантных и ДНК-вакцин против инфекционных болезней [567; 515; 367; 210; 218].

Для создания вакцин против ЛДР потенциально перспективными являются структурные вирусные гликопротеины, используемые в качестве антигенов, индукторов антительного ответа, обычно коррелирующего с протективной активностью препарата [509; 515; 308; 271].

Впервые изучение экспрессии белков вируса ЛДР в эукариотической системе была проведена 1986 году Keegan K. и Collett M.S. Авторами был секвенирован полученный в *E.coli* гликопротеин Gn, определены его аминокислотная последовательность и сайты гликозилирования [313]. Dalrymple J.M. с соавт. (1989) при проведении картирования протективных детерминант на гликопротеинах Gc и Gn вируса ЛДР определили на поверхности гликопротеина Gn три нейтрализующих эпитопа [190]. В дальнейшем рядом авторов была подтверждена индукция вируснейтрализующих антител (ВН) и возможность создания протективного иммунного ответа после введения животным экспрессированных структурных белков Gc/Gn [134; 141; 143; 199; 259; 515; 573].

В качестве альтернативы инаktivированным вакцинам против ЛДР были разработаны вакцины на основе не реплицирующихся вирусоподобных частиц (ВПЧ), состоящих из оболочечных гликопротеинов Gc/Gn и белка нуклеокапсида вируса ЛДР. ВПЧ имеют преимущество перед отдельными

протеинами с точки зрения их антигенной стабильности и иммуногенности [238; 260; 378; 379]. Так трехкратное введение 10^6 ВПЧ, в отличие от введения отдельных вирусных белков, обеспечивает 100% защиту мышей от контрольного заражения вирулентным штаммом вируса и индуцирует синтез ВН антител в пределах 1:250-1:1250 [418; 487].

При использовании эукариотической векторной системы на основе вируса осповакцины Kakach L.T., с соавторами [308] удалось экспрессировать рекомбинантные белки, кодируемые М-сегментом генома вируса ЛДР, обладающие протективными свойствами [247; 118; 542]. Аналогичные результаты были получены Schmaljohn C.S., с соавторами (1989г.) при экспрессии этих белков в бакуловиральной системе [515], что позволило перейти к разработке рекомбинантных и ДНК-вакцин [450; 442; 542; 567].

На следующем этапе развития рекомбинантных технологий для разработки защитных иммунопрепаратов против ЛДР Gorchakov R. с соавторами (2007) изучили формирование протективного иммунитета против ЛДР вирусных рекомбинантных вакцин на основе репликонов Венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ), вируса Синдбис, альфавируса, экспрессирующих белки Gc, Gn, и NSm. Отмечена индукция синтеза ВН антител в высоких титрах (1:80 и выше), клеточный иммунный ответ и устойчивость животных против контрольного заражения [233; 275].

С использованием методов обратной генетики Kortekaas J., с соавт. (2010) был получен рекомбинантный вирус, в качестве вектора использовали вирус болезни Ньюкасла, который при однократном внутримышечном введении вызывал образование ВН антител к вирусу ЛДР и обеспечивал устойчивость животных к контрольному заражению [333; 367]. Очередной этап развития вакцинологии начался с появлением положительных результатов ДНК-вакцинации. Иммунизация плазмидой, с генами, кодирующими вирусный/или вирусные протеины является иным механизмом стимуляции иммунного ответа [606; 607; 573; 210].

Wei Sheng и WuXue Bao в 2007 г. установили, что введение плазмид с генами, кодирующими основные гликопротеины вируса ЛДР - Gn, Gc и G(n+c) - мышам линии BALB/c, позволяет получить высокоэффективный иммунный ответ [598]. Продолжение исследований по созданию ДНК-вакцин против лихорадки долины Рифт было осуществлено Lorenzo G., Martin R. с соавторами, 2010 г.; Boshra H., Lorenzo G., [370; 371; 150] показали, что праймирование с использованием плазмид, кодирующих нуклеопротеин и гликопротеин вируса ЛДР, повышает эффективность иммунизации аттенуированными вакцинами, одновременно сводя к минимуму возможные осложнения от их использования. Титр вирусспецифических антител и Т-клеточный ответ у этих животных имел более высокий уровень, чем при иммунизации по той же схеме плазмидой, кодирующей только гликопротеины.

Последующие работы Lagerqvist N., Naslund J. и соавторов подтвердили эффективность иммунизации с помощью плазмид, кодирующих гены белков нуклеопротеина и гликопротеина вируса ЛДР [339; 344; 329]. Безопасность разрабатываемых вакцин против ЛДР является важным моментом. ДНК-вакцины имеют повышенный уровень безопасности. Кроме того синтетический CpG ODN, входящий в состав ДНК-вакцины (дцДНК плазмиды, синтетический CpG ODN, входящий в состав ДНК-вакцины) и стратегия гетерогенной прайм-бустерной иммунизации позволяют устранить антигенный импринтинг. При первой иммунизации и массовой вакцинации (АГ импринтинг – другое название — феномен первичного антигенного греха; при развитии повторной инфекции АТ синтезируются на первый АГ, АТ ко второму антигену не обладают ВН активностью. Образуются низкоавидные АТ. Такие антитела являются причиной другого малоизученного иммунологического феномена – антитело-зависимого усиления инфекции) [74].

Дальнейшие разработки по совершенствованию интраназальной и пероральной иммунизации вакцинами нового поколения перспективны ввиду

их способности вызывать развитие иммунитета слизистых оболочек и системного иммунного ответа. Этот факт особенно важен ввиду аэрозольного заражения ЛДР при контакте с инфицированным материалом и учетом горизонтальной передачи у животных [261; 160].

Однако как показали результаты исследования LagerquistN. (2013) по интеграции последовательности, кодирующей N белок и неполный ген белка Gn в геном растения даже получаемая перорально большая доза белка индуцировала низкие титры антител. Такие же результаты получены при иммунизации кроликов N белком вируса Пуумала (Хантавирус) [314]. Основным препятствием применения пероральных «съедобных» вакцин является доза и кратность применения ввиду возможного развития оральной толерантности [492], хотя производство антигенов в растениях является экономически эффективным [372; 484; 544].

За более чем 10-летнюю историю существования «генетической иммунизации» были выявлены как очевидные преимущества, так и недостатки. Главными преимуществами ДНК-вакцин являются их способность индуцировать клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также возможность их использования для создания вакцин против особо опасных и плохо культивируемых *in vitro* патогенов. Среди недостатков ДНК-вакцин следует отметить возможный атипичный процессинг бактериальных антигенов в клетках млекопитающих и низкий (по сравнению с традиционными вакцинами) уровень гуморального иммунного ответа. Возможность инсерционного мутагенеза не может восприниматься в качестве существенного недостатка, так как это чрезвычайно редкое событие, происходящее с частотой 1 на 150 тыс. ядер. Это более чем в тысячу раз меньше частоты возникновения спонтанных мутаций [32].

2.9. Стратегии контроля гриппа птиц, болезни Ньюкасла и лихорадки долины Рифт

В программе борьбы с инфекционными болезнями вакцинация является важным инструментом в стратегии контроля [13; 39; 53; 74; 94; 174; 201; 219; 139; 300; 545; 606]. Она используется для регулирования и искоренения возникших инфекционных болезней. С 1959 года произошло двадцать девять эпизоотий высокого патогенного гриппа птиц (HPAI; ВПГП) [144; 225; 485; 486, 489, 490; 548]. Двадцать четыре ликвидированы в результате санитарного убоя без стратегии вакцинации. Тем не менее, в некоторых странах, применение этой программы не достигло желаемого контроля распространения вируса или ликвидации инфекции. Таким образом, вакцинация была добавлена как дополнительный компонент контроля для поддержания сельского хозяйства как средства к существованию и уменьшения количества клинических вспышек гриппа птиц. Для борьбы с гриппом используются в ветеринарии инактивированные вакцины из штаммов гомологичных по НА и гетерологичных по NA подтипам, с целью дальнейшей дифференциации вакцинированных и инфицированных животных. Программы вакцинации против гриппа птиц подтипа H5 использованы в США, Италии, Мексике, Гватемале, Египте, Нидерландах, Франции, России, Вьетнаме, Пакистане [173; 558; 57]. Комплекс мероприятий, используемый для контроля слабо и высокопатогенного гриппа птиц включает программу традиционного санитарного убоя.

Контроль распространения болезни Ньюкасла осуществляется во многих странах путем вакцинации. Однако она не была широко использована в Европе до третьей панзоотии в 1970-х годов. Современные программы контроля болезни Ньюкасла включают живые аттенуированные и инактивированные вакцины. МЭБ для производства вакцин рекомендует использовать тщательно протестированные штаммы: для живых вакцин они должны иметь индекс интрацеребральной патогенности (ICPI) менее 0,4; штаммы, используемые для изготовления инактивированных вакцин должны

иметь ICPI меньше 0,7. Для обеспечения лучших программ вакцинации принят метод прогрессивных прививок, который заключается в последовательном применении вакцин более вирулентных штаммов [405;104]. Применяется во многих странах вакцинация голубей, так как взаимодействие их с промышленной (домашней птицей) не исключает передачу вируса [428]. При разработке новых вакцин в настоящее время учитывается генотип возбудителя и антигенная характеристика штамма [399]. Однако, по мнению Miller P.J. (2010) и PerozoF. (2008) вакцинация может вызвать селективное давление, которое возможно приводит к появлению новых штаммов вируса [399; 456].

Существует несколько доступных вариантов контроля ЛДР, таких как вакцинация восприимчивых животных, применение ларвицидов в местах размножения векторов и/или распыление инсектицидов, контроль торговли животными. Однако о распространении болезни в популяциях животных обычно хорошо известно к тому времени, когда наблюдаются первые случаи заболевания у людей [162]. В эндемичных районах, вакцинация животных является лучшим способом защитить здоровье человека. Что касается наблюдения в свободных от ЛДР областях, в том числе угрожаемых зонах повышенного риска, использование сентинельного (дозорного) стада и постоянный ретроспективный анализ ранних антител класса IgM является определяющим активность вируса. От обнаружения синдрома и комплекса аномального состояния, а не клинических признаков болезни зависит раннее выявление ЛДР и таким образом уменьшает запаздывание между началом вспышки и постановкой диагноза. Эта методология может быть полезной альтернативой в случае ЛДР, которая может вызвать неспецифические признаки у людей и любого вида животных. Так случаи ЛДР в популяции человека были обнаружены в 2009 году на о. Майотта благодаря надзору за гриппоподобным (денге-подобным) синдромом [387].

Борьба со вспышками ЛДР требует различных действий, от ограничения циркуляции животных, уменьшения числа контактов человека и животных,

посредством кампаний по охране здоровья и гигиены, осведомленности и целевых мероприятий для населения, подвергающегося риску. ФАО и ВОЗ имеют общую стратегию реализации планов во время вспышек ЛДР, где вакцинация является важным инструментом. Вакцинация восприимчивого поголовья должна начинаться до обнаружения вспышки. После начала вспышки не следует вакцинировать животных, так как существует высокий риск ее интенсификации. Целью встречи в штаб квартире ФАО 2012 г. было обсуждение необходимости разработок и внедрение наиболее перспективных безопасных и эффективных вакцин против ЛДР, обеспечивающих возможность выбора и введение на рынок [483; 43].

Также для контроля и предотвращения вспышек ЛДР должны использоваться мониторинг погодных условий. Успешно предсказаны за 2-4 месяца вспышки ЛДР в Восточной Африке, благодаря модели управления данными дистанционного зондирования [111], которая является системой раннего предупреждения на основе точного знания эпидемиологии заболевания, давая время для проведения профилактических мероприятий. Исключение тесного контакта с животными, особенно с их биологическими жидкостями или возможности аэрозольного попадания вируса.

Для всех стран разработаны национальные программы контроля и успешной борьбы с инфекционными болезнями, компоненты которой включают карантинные мероприятия; ограничение и контроль передвижения животных; отслеживание диких животных (домашних животных и синантропной птицы) в области вспышки болезни; усиление мер биологической безопасности; просвещение и повышение осведомленности фермеров о болезни; экспресс-диагностику; убой в случае получения положительных результатов; дезинфекцию, обеззараживание и утилизацию инфицированных материалов.

2.10. Заключение к литературному обзору

Анализ данных литературы показал непредсказуемость появления, тенденцию дальнейшего территориального распространения и внедрения вирусов отряда *Mononegavirales*, таких как грипп птиц, лихорадка долины Рифт, болезнь Ньюкасла; способность вирусов быстро адаптироваться к новой экосистеме; наличие нерешенных вопросов, касающихся эпизоотологии/эпидемиологии особо опасных инфекций, их оперативной диагностики и специфической профилактики [70; 130].

Повышенный интерес к вирусам гриппа, болезни Ньюкасла и ЛДР обусловлен высоким потенциалом их патогенности, сложившейся на данный момент эпизоотической ситуацией по болезням, вызываемым данными вирусами. Продолжающиеся тенденция территориального расширения и распространения; появление внезапных вспышек ЛДР при сокращении межэпизоотического периода; усиление, увеличение числа и степени постинфекционных осложнений и фатальных исходов [520; 523; 530]; определение аэрозольного заражения вирусом ЛДР, его вертикальной передачи [172; 161; 162; 206; 232; 290; 311; 371;].

Юго-Восточная Азия по-прежнему остается источником появления и выявления новых реассортантных вирусов гриппа птиц (H5N8; H5N6; H7N9); новых генотипов (V-VII) вируса болезни Ньюкасла, в большинстве своем, велогенных и способных размножаться в организме птиц, вакцинированных коммерческими вакцинами, вплоть до 100% поражения птицепоголовья [173].

Выявление практически одновременно на двух континентах – Северной Америке и во Франции нового типа вируса гриппа от свиней и крупного рогатого скота, названного *influenza virus D*. Способность вируса вызывать инфекцию у хорьков указывает на потенциальную угрозу данного вируса для человека.

Повышенный интерес также обусловлен обнаружением онколитической способности вируса болезни Ньюкасла. Благодаря особенности репликации, потенциалом использования авирулентных штаммов вирусов отряда

Mononegavirales (болезни Ньюкасла, гриппа птиц, ЛДР) для разработки рекомбинантных вирусных векторных вакцин [161; 545; 546; 457].

Анализ данных литературы также показал тенденцию роста разработок вакцин нового поколения и повышения их эффективности [126; 160; 186; 198; 392; 376; 429]. Многими авторами показана перспективность и целесообразность использования плазмидных конструкций при праймировании иммунной системы реципиента [461; 572; 613]. Использование штаммов имеющих биомаркеры, антитела к которым позволяют дифференцировать вакцинированных и инфицированных животных [451; 457].

Инструментом изучения и выявления подобных маркеров, а также единичных аминокислотных замен и делеций являются МКА узкой направленной специфичности, получение которых возможно с применением достижений современной молекулярной биологии, иммунологии и биотехнологии [619; 401; 402; 403; 535; 341].

Краткий обзор состояния гибридной технологии, современной вакцинологии, иммунологии, направленных на создание иммунореагентов и антигенов иммуноанализа, средств профилактики особо опасных болезней, в том числе экзотических для нашей страны, показывает перспективность и актуальность выбранного направления проведения исследований по разработке и совершенствованию средств диагностики и специфической профилактики особо опасных инфекций.

3 СОБСТВЕННЫЕ ИСЛЕДОВАНИЯ

3.1 Материалы и методы

3.1.1 Материалы

3.1.1.1 Вирусы, антигены, сыворотки, используемые в работе

Таблица 1

Перечень и основные характеристики вирусных штаммов, использованных в работе

Наименование используемых штаммов, болезнь	паспортные данные		
	Уровень патогенности	Активность штамма	
		Инфекционная	антигенная
Штаммы вируса гриппа А		Lg ЭЛД/ ЭИД ₅₀ /см ³	РГА Log ₂
A/ chick/Alberta/35 H1N1	Высокопатогенный вирус гриппа (ВПВГ)	7,5-8,0±	6-7
A/свинья/Меротин/ H1N1	Патогенный для свиней	8,5-9,0	9-10
A/курица/Украина/H3N8	ВПВГ	7,5-8,0	7-8
A /chick/Schotland/59/H5N1	ВПВГ	8,25-8,75	8-9
A/chick/US/Pensilvania/1370/83/ H5N2	ВПВГ	8,5-9,0	8-9
A/tern/South Africa/61/ H5N3	НПВГ	8,5-9,0	9-10
A/курица/Курган/01/05/ H5N1	ВПВГ	7,5-8,0	6-7
A/курица/Ростов-Дон/01/05/ H5N1	ВПВГ	7,75-8,25	6-7
A/утка/Новосибирск/01/05/ H5N1	ВПВГ	7,5-8,25	5-7
A/цыпленок/Самарканд/67/ H7N2	ВПВГ	8,0-8,5	8-9
A/цыпленок/Росток/29 H7N7	ВПВГ	7,5-8,0	6-7
A/индюк/Висконсин/66 H9N2	ВПВГ	7,5-8,25	
Штаммы вируса болезни Ньюкасла			
Ла-Сота	вакцинный	7,0-9,5	10-11
B1	вакцинный	8,0-8,5	9-10
Томилинский Т-53	вирулентный	7,5-10,0	8-9
Штамм вируса инфекционной бурсальной болезни Winterfield-2512	вакцинный	7,5-8,0	Не обладает
Штаммы вируса ЛДР		МЛД ₅₀ /см ³	РНГА
1974-ВНИИВВиМ	Аттенуированный	8,5-8,9	256-512
RVF/2002/09/ПС	аттенуированный	7,0-8,0	256-512
RVF(s)13	аттенуированный	7,25-8,5	128-256
RVF(v)	аттенуированный	7,75-8,3	128-256
Энтеббе	вирулентный	6,5-7,0	64-128
Сахарозо-ацетоновые антигены (САА) ЛДР, Акабане, Найроби, Арумовот	Активность в: РНГА – 512-1024; РСК – 32-128; ТФ ИФА – 2048-4096		
Иммуноасцитические жидкости (ИАЖ) к вирусам ЛДР, Акабане, Найроби, Арумовот	Активность в: РЗНГА – 512-2048; непрямом ТФ ИФА – 2048-4096		

3.1.1.2. Животные

Для освежения вирусных штаммов; накопления вируссодержащего материала использовали: СПФ эмбрионы кур 10 - 11-суточного возраста, мыши линии BALB/c 3-4 недельного возраста массой 10-15 г, мыши линии BALB/c взрослые рожавшие самки массой 20-30 г, мыши белые беспородные 1-3 суточного возраста, массой 20-30 г, кролики породы Шиншилла массой 2-3 кг, петухи породы Леггорн массой 2,5-3 кг, овцы Романовской породы и Прекос, массой 35-40 кг.

Клинически здоровых животных получали из питомников «Столбовая», «Пушино» РАМН и сектора подготовки подопытных животных ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. СПФ ЭК получали из Щелковского биокомбината. В исследованиях использовали только клинически здоровых животных. Работу с животными выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №266 Минздрава России от 19.06.2003 г.)

3.1.1.3. Культуры клеток

Для культивирования вирусов и приготовления антигенов использовали перевиваемые культуры клеток: -почки собаки (спаниэля) - (MDCK), катал. № 32 (каталог ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии); -почки зеленой мартышки CV-1, катал. № 25 (каталог ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии); -почки сибирского горного козерога (ПСГК), катал. № 60 (каталог ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии); -почки сирийского хомячка ВНК-21/13, катал. № 52 (каталог ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии); -миеломная линия клеток Sp 2/0-Ag 14.1 (Sp 2/0)дефектная по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ).

Культуры клеток получали в лаборатории «Биология и культивирование вирусов» и «Культуры клеток с музеем клеточных штаммов» ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

3.1.1.4. Гибридомы

Клоны гибридом, полученные во ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, продуцирующие МКА к нуклеопротеину вирусов: гриппа А, в том числе гриппа птиц [Черных А.А., 1988]; парамиксовирусов

птиц, в том числе болезни Ньюкасла, полученные [Лазарева Л.Н., 1988]; лихорадки долины Рифт, полученные [Колосова М.В., 2000]. К гемагглютиниру Н5 и Н7, полученные [Жиангеровой О.В., 2009]. К фосфопротеину р30 вируса АЧС, полученные [Першиным А.С., 2013].

3.1.1.5. Рекомбинантные плазмиды и рекомбинантные белки

ДНК-конструкции и рекомбинантные белки любезно предоставлены сотрудниками ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии Казаковой А.С.; Каталымовым А.С.; Власовой Н.Н.; Иматдиновым И.Р.

3.1.1.5.1. Препарат плазмидной ДНК клона рТТ9/ASFVp30 из клеток E.coli штамма BL21(DE3)pLysS (Promega)cT7 промотором (Казакова А.С.).

3.1.1.5.2. Препараты плазмидной ДНК клонов рCI-neoGn2/2 и рCI-neoGc3/3 под контролем CMV-промотора (Иматдинов И.Р.).

3.1.1.5.3. Препараты плазмидной ДНК клона рЕТ32b/ЛДР/NP/3/9b клеток E.coli штамм KRXcT7 промотором (Иматдинов И.Р.).

3.1.1.5.4. Препараты плазмидной ДНК клона рInfNP (5185 п.о.), рInfNA5 (3141 п.о.) из клеток E.coli штамма BL21(DE3)pLysS (Promega)cT7 промотором.

Препараты рекомбинантных белков р30 вируса АЧС, Gn и NC вируса ЛДР, NP вируса гриппа А очищены методом металло-хелатной аффинной хроматографии. Степень очистки оценивали методом электрофореза в ПААГ [92].

3.1.1.5.5. Синтетические неметилированные модифицированные CpG ODN
5'-**tcgtcgttttgcgttttgcgtt**, в области **cg** фосфодиэфирная связь модифицирована фосфотиоловой связью (4 модификации). Получены из ООО НПФ «Литех», г.Москва

3.1.1.6. Питательные среды и добавки к ним

В работе использовали стандартные среды, сыворотки, белки и ферменты, хроматографические сорбенты и гелеобразующие среды, кислоты и основания, растворители, красители и хромогенные субстраты, реактивы фирм «Difco», "Sigma"(США); "Serva", "Merck" (Германия); Реанал (Венгрия); "Pharmacia" (Швеция), необходимые для культивирования перевиваемых линий клеток [11], миелоидных клеток, гибридом; проведения биохимических

исследований, основываясь на стандартных процедурах твердофазного иммуноферментного анализа [37;66; 8; 1;76; 78].

3.1.1.7. Оборудование

Для проведения боксовых работ с культурами клеток использовали комплект оборудования, необходимый для проведения стерильных работ по культивированию культур клеток, гибридной технологии, биохимических, иммунологических исследований, иммуноферментного анализа использовали необходимый комплект оборудования, освещенных в методических рекомендациях включающий:

- шкаф с ламинарным вертикальным потоком стерильного воздуха (ВАВСОК-BSH, ФРГ); CO₂-инкубатор (SANYO, Япония); водяной термостат (ТЖ-0-03); шейкер для 96-луночных пластин "TITERTECK" (Flow, Англия); холодильник бытовой; холодильник низкотемпературные на минус 20⁰С, 40⁰С, 70⁰С (Revco, США); комплект одноканальных автоматических микропипеток (2-1000 мкл) (Gilson, Франция); комплект многоканальных автоматических микропипеток (30-300 мкл) (Ленпипет, Россия); комплект пластин для культивирования клеток (Costar, США);

сосуды для криоконсервации (Costar, США); магнитная мешалка. Для центрифугирования образцов использовали: центрифугу Т-23 (ГДР); ультрацентрифугу Beckman L-65 (США); настольную центрифугу Eppendorf Model-1415 (Швеция). При проведении микроскопии использовали инвертированный микроскоп СК-2 (Olympus, Япония). Для фотометрического учета результатов ИФА использовали восьмиканальный фотометр "Titertek Multiscan-340" ("Labsystem", Финляндия).

Для взвешивания использовали весы: лабораторные на 1 кг; аналитические (ВЛА-200) (СССР); торсионные WT 5070 (Польша); электронные "Gibertini" (Италия).

3.1.2. Методы

3.1.2.1. Получение культурального вируссодержащего материала

Для получения культурального вируссодержащего материала проводили заражение суточной монослойной культуры клеток ВНК-21, MDCK, ПСГК, ПС по общепринятой методике. Из расчета 1,0-0,001 ТЦД/кл. с часовой

адсорбцией вируса при 37°C и инкубированием при той же температуре в CO₂инкубаторе с 5% CO₂ и 96% влажности в течение 24 часов.

Титр инфекционной активности вируссодержащего материала проводили путем расчета 50 % эффективной дозы по общепринятому в вирусологии методу Рида и Менча [75].

3.1.2.2. Определение концентрации белка

Определение белка проводили по методу Lowry et al. (1951). В качестве калибровочного стандарта использовали сывороточный бычий альбумин кристаллический фирмы Sigma (США).

3.1.2.3. Иммунизация мышей

Мышей линии BALB/c - доноров спленоцитов при получении гибридом, нелинейных иммунизировали соответствующим антигеном по разработанным схемам.

Предварительно перед постановкой опыта гибридизации определяли уровень сывороточных антител у иммунизированных мышей непрямым ТФ ИФА и РНГА. Внутриселезеночную иммунизацию мышей проводили в асептических условиях методом орперативного вмешательства введения антигена. В качестве доноров-спленоцитов брали особей имеющих наивысший титр специфических антител.

3.1.2.4. Базовый протокол получения моноклональных антител,

включающий основные этапы приготовления культур перитониальных макрофагов мыши; гибридизации; скрининга антителопродуцентов непрямым ТФ ИФА; клонирования миелом и гибридом; криоконсервирования клеток; замораживания и восстановления гибридом; получения ИАЖ; очистка иммуноглобулинов подробно описаны в работах Мак-Керн Т.Д. (1983); Абелева, Г.И. (1998); Браун Дж., (1991); Егорова А.М., (1991); Ягудиной Р.И. (2013); Gefters ML, (1977); Gooding JV (1980).

3.1.2.5. Скрининг гибридных антителопродуцентов

Исследование культуральных жидкостей гибридных клонов на наличие продукции специфических моноклональных антител к антигенным детерминантам изучаемых вирусов проводили через 7 - 10 дней с момента начала клонообразования трехкратно с трехдневным интервалом. Скрининг

проводили методами непрямого ТФ-ИФА по общепринятой методике, на полистироловых пластинах (Cliniplate; Dynatechmicroelisa; Nunc), основываясь на стандартных процедурах твердофазного иммуноферментного анализа [Егоров А.М. и др, 1991]; иммуноцитохимического анализа (ИЦХ) на монослое чувствительных культур клеток; РАЛ адаптированной для скрининга МКА к эпитопам гликопротеина вируса ЛДР, фосфопротеина вируса АЧС.

Непрямой метод пероксидазного иммуноцитохимического анализа

Для выявления вирусных антигенов и скрининга специфичности полученных МКА, к антигенам гликопротеина вируса ЛДР, использовали непрямой метод цитохимического иммуноферментного анализа на монослойных культурах клеток ПС, ВНК-21, инфицированных соответствующим вирусом из расчета 0,1-1,0 ИД₅₀/клетку. Один вертикальный ряд лунок оставляли интактным. Пластины инкубировали при температуре 37°C, в атмосфере 95% влажности и 5% CO₂ в течение 24 часов до начала проявления первых признаков ЦПД. По окончании срока культивирования среду удаляли, монослой двукратно отмывали ФБР (pH 7,4). Фиксировали в зависимости от цели исследования охлажденным (минус 20°C) 80% раствором ацетона на ЗФР pH 7,2-7,4 или 0,05% раствором глутарового альдегида. Остаточные сайты сорбции блокировали 0,5% раствором казеинана ФБР-Т- pH 7,4 в течение часа при комнатной температуре. Пластины высушивали в потоке воздуха и хранили при минус 70°C до использования. Фиксированные клетки могли храниться при минус 20°C в течение 2-3 месяцев без снижения активности.

Дальнейшее описание стандартизации непрямого метода гистохимического иммуноферментного анализа для скрининга гибридом (определение рабочего разведения контрольных специфической и нормальной сывороток, конъюгата антивидовых антител и т. п.) изложены в результатах исследования.

3.1.2.6. Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител

Определение классов и подклассов моноклональных иммуноглобулинов

Классы и подклассы полученных МКА определяли с использованием набора для изотипирования антител мыши «ISO-1» (Sigma, США), согласно прилагаемой инструкции.

Электрофоретический анализ и иммуноблоттинг

Анализ определения полипептидной специфичности моноклональных антител, специфичности рекомбинантных белков проводили по методу, описанному Laemli U.K. Работу выполняли совместно с Козаковой А.С. Пробы для электрофореза готовили добавлением равного объема 0,08 Трис-НСl буфера, рН 6,8, содержащего 4 % додецилсульфата натрия, 20 % (v/v) глицерина, 0,02 % бромфенолового синего и 0,2 М дитиотрейтола) и инкубировали при 99°C на водяной бане в течение 10 минут. Электроперенос разделенных в геле белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли полусухим методом на аппаратуре фирмы «Pharmacia» согласно инструкции. Далее проводили блокировку мембраны 0,02 М ФСБ с 0,1 % твина-20 и в течение 12-18 часов при 4°C. Постановку непрямого ТФ-ИФА проводили по общепринятой методике, на нитроцеллюлозной мембране, основываясь на стандартных процедурах иммуноферментного анализа [Егоров А.М. и др, 1991]. Мембрану отмывали, помещали в субстратную смесь – 0,02 М ФСБ с 0,1 % твина-20, 0,001 М 3,3 –диаминобензидин тетрагидрохлорида и 0,5% (v/v) перекиси водорода, - и выдерживали до проявления окрашенных полос. Молекулярные массы рассчитывали, используя компьютерную программу «Molmas.bas».

Метод непрямого ингибирования ТФ ИФА

Для определения специфичности полученных МКА использовали метод непрямого ингибирования ТФ ИФА.

В пластины для ИФА с иммобилизованными на твердой фазе соответствующими антигенами вируса вносили в 2 лунки по 0,1 см³ исследуемой культуральной жидкостиклонов гибридом. После инкубирования и удаления несвязавшихся компонентов вносили в лунку планшета предварительно подобранные рабочие дозы гипериммунной

сыворотки крови к соответствующему вирусу и нормальной сыворотки крови животного, от которого была получена специфическая сыворотка. Результат реакции учитывали через 1 час после внесения свежеприготовленного субстратного раствора на основе ABTS визуально и спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

Конкурентный ИФА для определения эпитопного картирования

Для изучения топографии эпитопов на антигенах гликопротеина вируса ЛДР исследовали конкуренцию меченных пероксидазой МКА различных клонов с немечеными МКА в ТФ-ИФА. Лунки полистироловых планшетов для ИФА сорбировали очищенным вирусным антигеном поверхностных белков или рекомбинантным белком Gp вируса ЛДР по описанной методике в разделе "Скрининг гибридом в ИФА". Активные сайты полистирола блокировали 0,5% раствором казеина на ФБР-Т. Затем в лунки планшетов вносили по 0,1 см³ МКА в возрастающей концентрации (0,1, 1, 10, 100 и 1000 мкг/см³ в ФБР-ТК) и инкубировали 1 час при 37⁰С, после чего лунки промывали и вносили по 0,1 см³ пероксидазных конъюгатов МКА в рабочем разведении на ФБР-Т-БСА. Через 1 час инкубирования планшеты вновь промывали и вносили в лунки по 100 см³ свежеприготовленного субстратного раствора ABTS. Учет результатов проводили через 1 час спектрофотометрически. Процент ингибиции определяли по формуле Lussenhopetal. (177): $I\% = [(OD1 - OD2)/OD1] \times 100$, где - I% - процент ингибиции, где OD1 - величина оптической плотности при связывании пероксидазного конъюгата МКА с антигеном в отсутствии конкурирующих немеченных МКА; OD2 - величина оптической плотности при связывании пероксидазного конъюгата в присутствии конкурирующих антител.

Ингибиция более 66% свидетельствовала о сильной конкуренции, в пределах 33-66% - о конкуренции средней силы, а ниже 33% - о слабой конкуренции или ее отсутствии. Постановку и учет результатов сэндвич-варианта иммуноферментного анализа для выявления антигена, прямого метода твердофазного иммуноферментного анализа проводили по стандартной методике. [Егоров А.М. и др., 1991]

3.1.2.7. Микровариант реакции нейтрализации

Для выявления вируснейтрализующих свойств поликлональных, мноклональных антител, использовали микрометод реакции нейтрализации с постоянной дозой вируса 100 ТЦД_{50/см3} и определением индекса нейтрализации. Титром ВН антител считали наибольшее разведение исследуемого материала, дающее 75% задержку развития специфического ЦПД.

3.1.2.8. Конъюгирование моноклональных антител с пероксидазой хрена

Синтез конъюгатов иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (тип VI, Sigma) осуществляли по методу перйодатного окисления фермента до альдегидной формы с последующим восстановлением боргидридом натрия по Tijssen (1985).

3.1.2.9. Сэндвич-вариант иммуноферментного анализа для выявления антигенов, прямой метод твердофазного иммуноферментного анализа для выявления специфических антител проводили по стандартной методике. [Егоров А.М. и др., 1991]

Относительное содержание специфических антител в сыворотках крови животных выражали в международных ИФА единицах - ЕУИФА и определяли по формуле: $EU = [(\sum OI_{\text{пробы}} - \sum OI_{K^-}) / (\sum OI_{\text{стандарт}} - \sum OI_{K^-})] \times 100$, где $\sum OI$ – сумма значений оптической плотности при определенной длине волны в зависимости от субстрата; стандарт – эталонная специфическая положительная сыворотка. При детекции результатов ТФ ИФА хемилюминисцентным методом, содержание специфических антител в сыворотках крови животных определяли по формуле:

$$EU = [(\sum RLU_{\text{пробы}} - \sum RLU_{K^-}) / (\sum RLU_{\text{стандарт}} - \sum RLU_{K^-})] \times 100,$$

где $\sum RLU$ – сумма значений световых единиц (RLU); интенсивность отраженного света при длине волны 380 нм; стандарт – эталонная специфическая положительная сыворотка.

Концентрация антител в пределах до 30 – отрицательные сыворотки; 30-40 – сомнительные; более 40 – положительные.

3.1.2.10. Определение функциональных свойств методов ТФ ИФА

Для определения функциональных свойств разработанных методов ТФ ИФА использовали рекомендации, указанные в руководстве МЭБ (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014. Часть 2,1,14). *Аналитическую чувствительность метода* определяли исследованием конечной точки разведения сыворотки (вирусного материала) с известным содержанием антител (антигена) к вирусу. *Аналитическую активность* – поределляли по степени перекрестной реактивности реакции с гетерологичными сыворотками (антигенами). *Диагностическую чувствительность* метода определяли в % по отношению количества положительных (П) к сумме положительных и ложно отрицательных проб (ИП+ЛО): $ДЧ = [П / (ИП+ЛО)] \times 100\%$. *Диагностическую специфичность* (ДС) метода определяли в % по отношению количества отрицательных (О) к сумме отрицательных и ложно положительных проб (О+ЛП): $ДС = [О / (О+ЛП)] \times 100\%$.

3.1.2.11. Определение иммунного статуса и цитокинового профиля

Уровень экспрессии генов цитокинов определяли в мононуклеарах периферической крови (или в клетках селезенки) белых мышей по наличию их мРНК методами ОТ-ПЦР в соответствии с методикой, предложенной VanGelderR.N. et al (1990). В работе были использованы пары мышинных праймеров для следующих цитокинов: ИФН- α , ФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- α . Все олигонуклеотиды получены из ЗАО «Синтол» (г. Москва). В качестве положительного контроля использовали праймеры для β -актина. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G 1758).

Определение иммунного статуса

Определяли: общее содержание лейкоцитов в периферической крови, процентное и абсолютное содержание лимфоцитов, уровень сывороточных иммуноглобулинов классов М, G; относительное содержание субпопуляций лимфоцитов, иммунорегуляторный индекс.

Лимфоциты выделяли из свежей гепаринизированной венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин ($\rho=1.077$ г/см³) при 400 g в течение 35-40 минут. Субпопуляции лимфоцитов анализировали по специфическому мембранному свечению в синем ультрафиолетовом свете с помощью люминесцентного микроскопа МБИ-15-2 (НПО «ЛОМО», г. С.-Петербург); по наличию на их поверхности специфических маркеров с использованием соответствующих специфических моноклональных антител (фирма «Сорбент», Москва). Относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих различные дифференцировочные антигены учитывали на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson США).

3.1.2.12. Нуклеотидное секвенирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидное секвенирование проводили при помощи генетического анализатора ABI 3730 и набора терминаторов цепи BigDye v.3.1 (Applied Biosystems, USA) согласно инструкции производителя. Для определения нуклеотидной последовательности изучаемых генов использовали те же специфические олигонуклеотиды, что и для проведения ПЦР.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи пакета прикладных программ BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3. по методу Clustal W. Выровненные нуклеотидные последовательности отдельных генов анализировали с использованием программы Mega 4.0.2.

3.1.2.13. Методы математического анализа

Статистический анализ результатов исследований проводили согласно рекомендациям Лакина Г.Ф. [Лакин Г.Ф., 1990; Манько В.М., 1990] с использованием персонального компьютера и пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2010, Statgraphics (Version 2.1.).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Совершенствование технологии получения антител заданной узкой направленности на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных белков

Целью исследований, приведенных в данном разделе, является изучение возможности применения генно-инженерных конструкций (рекомбинантных ДНК) и рекомбинантных белков для получения высокоактивных моноспецифических сывороток и моноклональных антител заданной узкой специфичности.

4.1.1. Изучение антигенных свойств рекомбинантных плазмид и рекомбинантных белков

Для предварительной оценки функциональной активности полученных рекомбинантных белков определяли их антигенную и иммуногенную активность.

Перспективность подхода использования рекомбинантных ДНК для получения моноспецифических антител показана на примере модельных систем, включающих конструкции: pCI-neo/Gc3/3, pCI-neo/Gn/2/2 и pETN32b, несущих вставку генов, кодирующих, соответственно, гликопротеины и нуклеопротеин вируса ЛДР; pInfNP, pInfHA5, кодирующих, соответственно, полноразмерный ген нуклеопротеина вируса гриппа А и консервативный участок гемагглютиниона вируса гриппа птиц подтипа H5; pTT9/ASFVp30, кодирующей конформационный эпитоп фосфопротеина Vp30 вируса АЧС. Контроль полученных ДНК-конструкций проводили методами рестрикционного анализа и ДНК-секвенирования. Результаты показали, что все они содержат вставки гена, кодирующего соответствующий специфический протеин.

Антигенную активность - способность изучаемых рекомбинантных белков реагировать с антителами к соответствующим возбудителям инфекционных болезней определяли в непрямом, ингибирующем вариантах ТФ ИФА и иммуноблотте с использованием специфических гипериммунных сывороток и иммуноасцитических жидкостей (ИАЖ) мышей.

Результаты оценки специфичности и антигенной активности полученных рекомбинантных белков в непрямом ТФ ИФА с антителами к возбудителям гомологичных и гетерологичных инфекционных болезней представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Специфичность и антигенная активность полученных рекомбинантных белков

Используемые препараты	Показатели специфического взаимодействия антиген/антитело (ОП ₄₀₅) в непрямом ТФ ИФА (n=3)				
	Рекомбинантные антигены вирусов				
	ЛДР			АЧС	Грипп А
	Gn	Gc	NC	P30	NP
Нормальная сыворотка	0,13±0,03	0,175±0,02	0,15±0,02	0,09±	0,16±0,03
Гипериммунная сыворотка к вирусу ЛДР	2,0±0,04	1,8±0,015	2,07±0,07	0,1±0,025	0,15±0,08
Гипериммунная сыворотка к вирусу гриппа птиц H5	0,19±0,07	0,168±0,01	0,2±0,08	0,16±0,007	1,9±0,02
Гипериммунная сыворотка к вирусу АЧС	0,09±0,03	0,12±0,09	0,11±0,007	1,8±0,02	0,17±0,07
Сыворотка к Gn/Gcвируса ЛДР	1,7±0,06	1,5±0,08	0,2±0,01	0,087±0,02	0,12±0,05
МКА клона 2D12 к NC в. ЛДР	0,097±0,02	0,12±0,01	1,67±0,02	0,14±0,05	0,085±
МКА клона 1C6 к NP в. гриппа А	0,12±0,08	0,15±0,045	0,15±0,07	0,2±0,015	2,1±0,04
ИАЖ** к вирусу ЛДР	1,97±0,015	1,2±0,04	1,7±0,05	0,13±0,02	0,17±0,07
ИАЖ к вирусу Найроби	0,17±0,01	0,2±0,014	0,15±0,03	0,09±0,017	0,15±0,015
ИАЖ к вирусу Акабане	0,15±0,009	0,2±0,01	0,175±0,016	0,11±0,02	0,13±0,05
ИАЖ к вирусу Арумовот	0,25±0,017	0,3±0,04	0,15±0,03	0,14±0,075	0,17±0,06

Примечание: ИАЖ** – иммуноасцитическая жидкость мышей, полученная методом иммунизации антигенами соответствующего вируса с последующим введением клеток саркомы Рауса. Жирным шрифтом отмечены положительные результаты реакции.

Результаты исследований показали, что полученные рекомбинантные белки – аналоги соответствующих вирусных белков обладали антигенной активностью. Они взаимодействовали со специфическими антителами, присутствующими в сыворотках крови животных и иммуноасцитических жидкостях, полученных на цельный нативный вирус, и не вступали в реакцию с антителами сывороток к гетерологичным вирусам. Отсутствие перекрестной

реактивности с антителами к близкородственным вирусам Арумовот, Акабане, Найроби свидетельствовало о высокой специфичности полученных рекомбинантных белков.

Полученные данные позволили: сделать вывод, что исследованные рекомбинантные белки обладали выраженной антигенной активностью; продолжить дальнейшее изучение их иммуногенных свойств и возможности использования в качестве антигенов при получении моноспецифических сывороток, моноклональных антител и разработке диагностических тест-систем иммуноанализа.

4.1.2. Получение и характеристика моноспецифических сывороток на основе использования ДНК-конструкций и рекомбинантных белков

Для определения иммуногенности и подтверждения аутентичности нативному вирусному белку синтезируемых *in vitro* и *in vivo* рекомбинантных белков первоначально намина лабораторных животных получены специфические сыворотки. Гибридный белок, способный в организме активно индуцировать образование сывороточных антител, может быть успешно использован для иммунизации мышей с целью получения моноклональных антител [1; 94].

На примере рекомбинантных плазмид: pCI-neoGn/Gc ЛДР, plnfnP грипп А, pTTASFVp30 АЧС и рекомбинантных белков RecGn и Recp30 проведены исследования по определению оптимальной иммунизирующей дозы для белых мышей линии BALB/c. Рекомбинантные ДНК-конструкции и рекомбинантные белки, полученные *in vitro*, вводили внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра в разных дозах. Через 21 день после их введения в сыворотках крови животных определяли уровень специфических антител в непрямом ТФ ИФА на основе соответствующего рекомбинантного белка и специфического антигена. Результаты отработки оптимальной дозы введения препаратов представлены в таблице 3.

Таблица 3

Зависимость титра антител от дозы вводимого препарата

Доза (мкг) вводимого препарата	Титр специфических антител на введение препаратов ($\log_2$) (n=3)						
	pCI-neo Gn/Gc	PlnfNP	pTTASF Vp30	RecGn		Recp30	
				Доза (мкг)	титр	доза (мкг)	титр
5	7,33±0,07	6,85±0,03	7,4±0,05	50	7,2±0,03	50	7,66±0,03
10	8,4±0,04	9,65±0,05	8,7±0,03	100	9,19±0,04	100	11,89±0,04
20	10,32±0,04	10,6±0,12	10,2±0,02	200	11,2±0,02	200	12,2±0,02
30	10,98±0,04	11,1±0,06	10,6±0,04	300	11,9±0,02	300	12,3±0,05
50	11,4±0,09	11,2±0,02	11,1±0,02	400	12,5±0,05	400	12,5±0,03

Полученные результаты, приведенные в таблице 3, показали, что рекомбинантные конструкции индуцируют дозозависимый антительный ответ белых мышей на их введение. Доза плазмиды 20 мкг и рекомбинантных белков 100 мкг и выше обеспечивает синтез антител в пределах, достаточных для получения впоследствии моноклональных антител. Увеличение дозы плазмидной ДНК более 30 мкг/мышь и рекомбинантных белков в дозе выше 100 мкг/мышь не привело к значительному увеличению титра антител. Поэтому в качестве оптимальной дозы введения ДНК-плазмид использовали 30-50 мкг/мышь и 100-200 мкг/мышь рекомбинантного белка. Для кроликов была также отработана оптимальная доза введения рекомбинантных конструкций составляющая 200-400 мкг/голову.

Рекомбинантную плазмиду вводили с адьювантом Фрейнда или в агарозном гидрогеле, который использовали в качестве адьюванта и постепенно рассасывающегося наполнителя, предохраняющего ДНК от воздействия клеточных протеаз.

Принцип и методическая сторона получения сывороток с использованием рекомбинантных конструкций подробно изложены в «Методических положениях по получению моносpezifической сыворотки к рекомбинантному белку р30 вируса африканской чумы свиней (АЧС)» [54, Приложение 8].

На примере ДНК-конструкций pCI-neo/Gc3/3 и pCI-neo/Gn/2/2, кодирующих гены гликопротеинов вируса ЛДР, изучена их способность экспрессировать *in vivo* гены целевых белков вируса ЛДР и, соответственно их синтез, определяемый по динамике накопления специфических антител. Для этого двум группам по 10 мышей в каждой вводили внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра - 1. группа - рекомбинантные плазмиды pCI-neo/Gc3/3; pCI-neo/Gn/2/2 на физиологическом растворе; 2. группа - рекомбинантные плазмиды pCI-neo/Gc3/3; pCI-neo/Gn/2/2 в агарозном гидрогеле. Полученные результаты накопления специфических сывороточных антител в результате последовательной иммунизации рекомбинантными ДНК и белками Gc/Gn, представлены на рисунке 3.

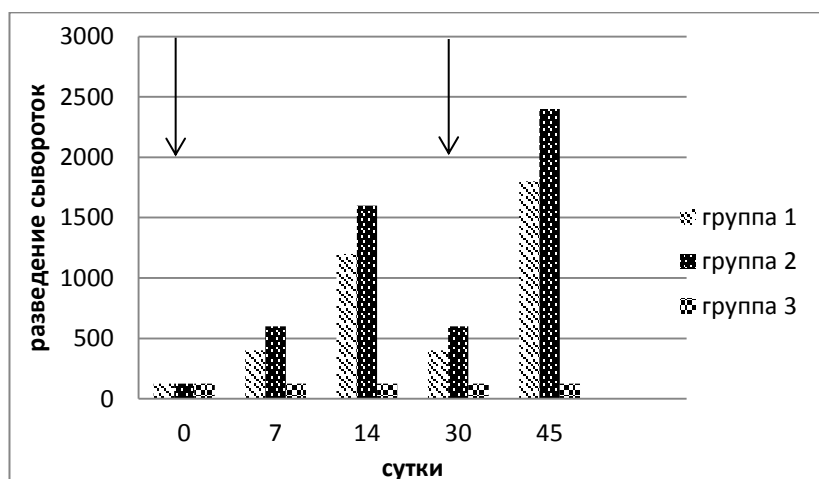


Рис. 3 –Динамика накопления специфических антител в результате ДНК-иммунизации и последующего введения рекомбинантного белка (через 30 суток введение 2 группам рекомбинантных белков Gn/Gc на целлюлозе): группа 1 - мыши, которым вводили рекомбинантные ДНК pCI-neoGn/Gc на 3ФР; группа 2 - мыши, которым вводили рекомбинантные ДНК pCI-neoGn/Gc в гидрогеле агарозы; группа 3 - контрольная группа мышей, которым вводили плазмиду pCI-neoGn без вставки; Стрелками указаны сроки введения препаратов.

Как видно из данных, представленных на диаграмме рисунка 3, рекомбинантные плазмиды при однократном внутримышечном введении (праймировании) индуцировали синтез вирусспецифических антител, выявляемых в непрямом ТФ ИФА на основе вирусного антигена, титр которых постепенно нарастал от 1:500-1:800 до 1:1200-1:1600 (в 2,0-2,5 раза) к

14 суткам после введения. К 30-35 суткам после инъекции отмечали снижение уровня антител до 1:300-1:600. Рекомбинантные белки Gn/Gc конъюгированные с целлюлозой введенные на этом фоне обеспечивали увеличение титров специфических антител, в 4,0-4,5 раза превышающих уровень антител на 30 сутки и достигающих значений 1:1600-1:2400 через 15 суток после инъекции.

Для подтверждения правильности выбранной схемы иммунизации на основе выбранной дозы введения рекомбинантной ДНК и рекомбинантного белка, получены моноспецифические сыворотки к иммунодоминантным диагностически значимым структурным белкам различных вирусов – к нуклеопротеину вируса гриппа птиц; фосфопротеину р30 африканской чумы свиней, типоспецифическому белку vр7 вируса блютанга и гликопротеинам Gn, Gc вируса ЛДР.

Для получения моноспецифической гипериммунной сыворотки к гемагглюнину пятого подтипа вируса гриппа птиц использовали следующую схему иммунизации –праймирование рекомбинантной ДНК, несущей вставку гена, кодирующего консервативный участок гемагглюнина подтипа Н5 вируса гриппа птиц с последующей трехкратной инъекцией с интервалом 14 суток концентрированного антигена гемагглюнина НА5 вируса гриппа птиц штаммовразличных субтипов по нейраминидазе, выделенных в разное время: Н5N1 (1959; 2005); Н5N2 (1983); Н5N3 (1961). Результаты изучения активности и специфичности полученных гипериммунных сывороток в различных серологических реакциях представлены в таблице 4.

Полученные данные исследований показали, что введенные рекомбинантные ДНК-конструкции и соответствующие рекомбинантные белки индуцировали синтез специфических антител в организме иммунизированных животных. Антитела полученных сывороток специфически взаимодействовали с антигеном соответствующего вируса в различных серологических реакциях.

Таблица 4

Активность и специфичность полученных сывороток при использовании принципа прайм-бустерной иммунизации

№ п/п	Целевой вирусный белок	Вводимые ДНК-конструкции и специфические антигены		Активность полученных сывороток (титр, n=3)				
		плазмида	белок	ТФ ИФА	РЗГА	РНГА	РН	РНИФ
1	Гемагглютинин HA5	pInfHA	HA5	6-12 тыс. *	300-1600	н/и	8-16	400-800
2	NP вируса гриппа А	pInf NP	rNP	8-16 тыс.	-	1200-2400	-	400-800
3	Прионный белок КРС	-	rPrP _{крс}	1600-2000	н/и	н/и	н/и	н/и
4	vp7 вируса блютанга	-	rvp7	2000-4000	н/и	н/и	н/и	н/и
5	P30 вируса АЧС	pTT9/ASF Vp30	rp30 трехкратно	6400-12800	н/и	н/и	н/и	256-512
7	Gn вируса ЛДР	pCI-neo/Gn/2/2	rGn/2/2 дважды	4800-9600	н/и	600-1200	32-64	128-256
8	Вирусспецифические антигены	Инактивированный вирус ЛДР		2400-4800	н/и	600-1200	32-64	128-256

Примечание: *- в таблице даны обратные значения разведений гипериммунных сывороток. Цветом выделена гомологичная прайм-бустерная иммунизация.

Результаты, представленные в таблице 4 показали, что полученные сыворотки обладали высокой специфической активностью в различных серологических реакциях: антитела моноспецифической сыворотки к HA5 вируса гриппа птиц с активностью в РЗГА 1:400-1:1600; ТФ ИФА - 1:6 тыс.- 1:12-16 тыс. взаимодействовали со всеми, имеющимися штаммами гомологичного подтипа и не вступали в реакцию с антителами сывороток к другим подтипам вируса гриппа птиц и гетерологичным гемагглютинирующим вирусам, возбудителям болезней птиц (НБ и ССЯ-76); антитела сыворотки к гликопротеину Gn вируса ЛДР, специфически взаимодействовали как с соответствующими рекомбинантным белком, так и с культуральным вирусным антигеном штаммов «1974-ВНИИВВиМ», «RVF2002/09-ПС» и сахарозо-ацетоновым антигеном вируса ЛДР. Сывороточные антитела к структурному белку vp7 вируса блютанга также реагировали с культуральным антигеном вируса блютанга различных (9, 4, 16) серотипов.

Согласно полученным данным, представленным в таблице 4, установлено, что при использовании гетерологичной прайм-бустерной иммунизации: праймирование рекомбинантной ДНК и бустирование соответствующим рекомбинантным белком или инактивированным антигеном титр сывороточных вирусспецифических антител оказался значительно выше (6400-12800), в отличие введения только рекомбинантного белка (resPrP_{KPC}; resvr7 вируса блютанга) или антигенов вирусных белков (ЛДР).

Кроме серологических реакций специфичность и активность полученных сывороток, определяли методом иммунопероксидазного окрашивания в культуре клеток чувствительных линий, инфицированных соответствующим вирусом.

Результаты непрямого пероксидазного иммуноцитохимического метода ИФА (ИЦХ ИФА) - визуальной детекции специфического взаимодействия сывороточных антител и антигенов гриппа птиц, АЧС, ЛДР представлены на рисунке 4.

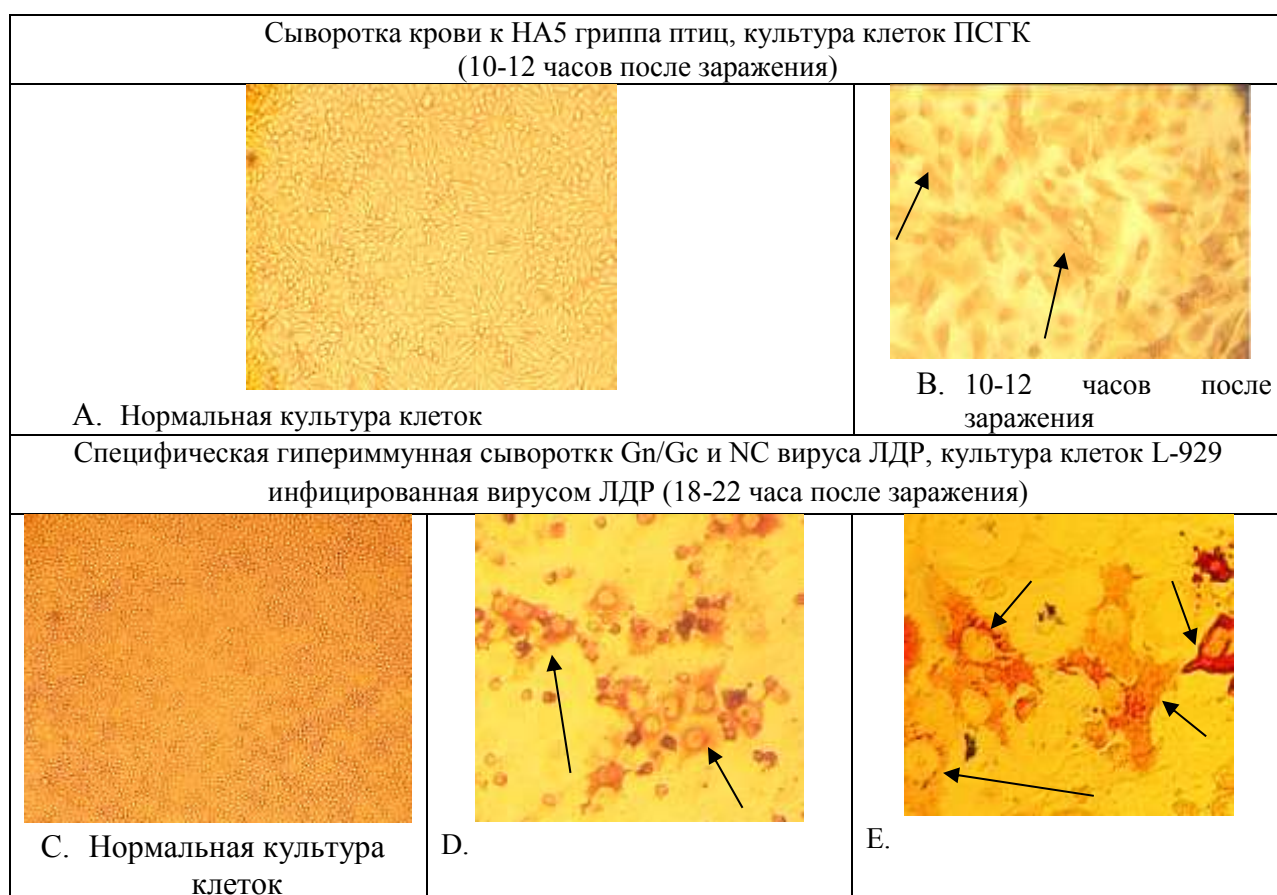




Рисунок 4 -Выявление локализации специфических вирусных антигенов в клетках перевиваемых линий, инфицированных вирусами особо опасных инфекций. (Пероксидазный ИЦХ ИФА метод, ув. x400 и x1000)

Представленные на рисунке 4 снимки демонстрируют выявление ИЦХ методом в течение первых суток после заражения антигенов соответствующего вируса в виде: группы клеток с диффузно окрашенной цитоплазмой (B, D, E); в виде гранул (E); отдельных инфицированных клеток (G) в течение первых суток после заражения; специфическое окрашивание практически всех клеток инфицированного монослоя (B), отсутствующие в контрольных препаратах (A, C, F). Таким образом, используя метод ИЦХ ИФА на основе моносенцифических гипериммунных сывороток, возможно выявление в течение первых 24 часов после заражения антигенных детерминант вирусных белков и их локализацию в клетках чувствительных линий.

Активность и специфичность полученных моносенцифических сывороток также определяли в иммуноблоттинге. На блоттограмме рисунка 5 показана (в качестве примера) активность и специфичность сывороток к гликопротеинам вируса ЛДР. В качестве специфического антигена использовали культуральный антиген вируса ЛДР.

Результаты, представленные на блоттограмме рисунка 5, показали, что рекомбинантные протеины, синтезированные *in vivo* и *in vitro* иммуногенны и способны индуцировать синтез специфических антител, которые взаимодействуют также с вирусным антигеном.

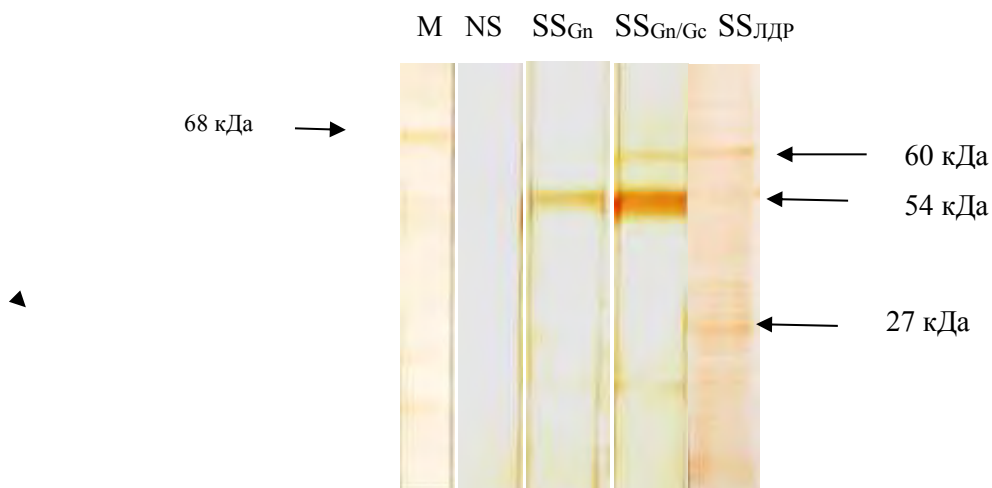


Рисунок 5-Активность и специфичность взаимодействия антител сывороток, полученных в результате прайм-бустерной иммунизации и специфического культурального антигена вируса ЛДР в иммуноблоттинге. М- маркер мол.мас.; NS- нормальная сыворотка мышей; SS_{Gn}; SS_{Gn/Gc} - сыворотки, специфические к гликопротеинам вируса ЛДР и SS_{ЛДР}- специфическая сыворотка к вирусу ЛДР.

Таким образом, представленные в данном разделе результаты показали, что рекомбинантные плазмиды и рекомбинантные белки при внутримышечном введении индуцируют у привитых животных синтез специфических антител (рисунок 3, 4, 5, таблица 4). Полученные положительные результаты послужили основанием для дальнейшего использования данных препаратов при получении МКА заданной узкой направленности.

4.1.3. Совершенствование технологии получения моноклональных антител и их характеристика

Целью данного раздела являлось:- получение панели МКА к гликопротеину G_n вируса ЛДР с использованием рекомбинантных конструкций; изучение специфичности полученных МКА и способности выявлять антигенные детерминанты вирусного белка G_n в инфицированных материалах; возможность использования полученных МКА для изучения репродукции вируса *in vitro* и контроля антигенности вирусосодержащего сырья, при изготовлении вакцин против ЛДР.

Отдельные этапы технологии получения моноклональных антител, проводимые по общепринятой методике (процесс слияния, клонирования, криоконсервирования и восстановления гибридом), подробно (детально) изложены в «Методических положениях по получению МКА к структурному белку р30 вируса АЧС с использованием рекомбинантных конструкций» и патенте на изобретение «Способ получения моноклональных антител к белку р30 вируса АЧС с использованием рекомбинантных конструкций» [54; Приложение 11 и 12].

Иммунизация - самый «творческий» этап; эффективность которой определяет в наибольшей степени конечный успех всего процесса получения моноклональных антител. Не существует какого-либо единого протокола иммунизации, так как выбор схемы иммунизации и использование различных приемов, повышающих ее эффективность, зависит от цели получения МКА и свойств конкретного антигена.

Одним из действенных методов иммунизации при получении гибридом является внутриселезеночная инъекция антигена. С этой целью проведены исследования по изучению иммунного ответа на внутриселезеночное введение рекомбинантных ДНК. Уровень иммунного ответа определяли по накоплению титра специфических сывороточных антител, стимуляции и дифференциации лимфоцитов селезенки. Результаты сравнительного антительного ответа на введенные рекомбинантных ДНК представлены на рисунке 6.

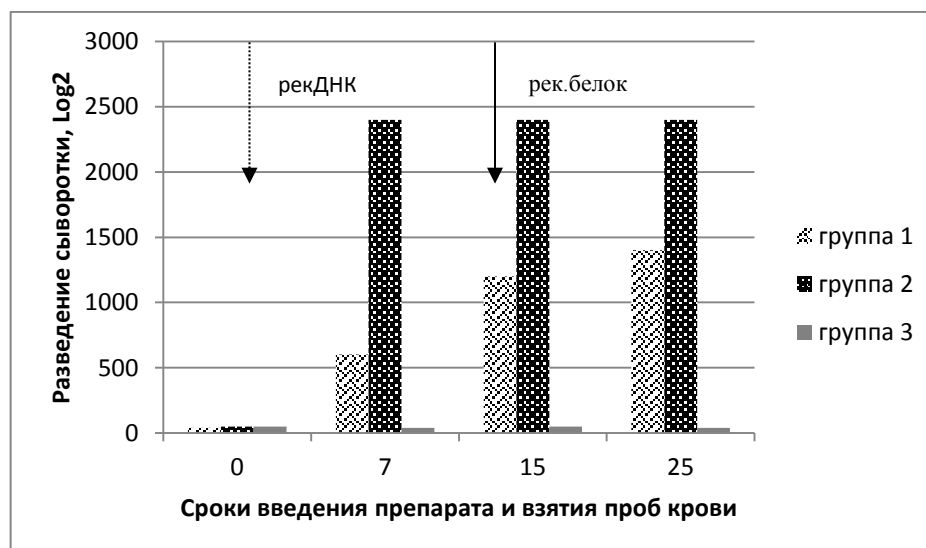


Рис. 6 - Индукция гуморального иммунного ответа на рекомбинантные ДНК при их внутримышечном и внутриселезеночном введении.

Группа 1- мыши, иммунизированные внутримышечно рекомбинантными ДНКрСІ-neo/Gc/3/3ирСІ-neo/Gn/2/2;

Группа 2 - мыши, иммунизированные внутриселезеночек ДНКрСІ-neo/Gn/2/2;

Группа 3 - мыши, иммунизированные внутримышечно рекДНКрСІ-neo без вставки. Стрелками указано сроки введения соответствующего антигена.

Как видно из результатов, представленных диаграммой рисунка 6, при внутриселезеночном введении (праймирование) ДНК-плазмиды, несущей вставку гена, кодирующего гликопротеин Gn вируса ЛДР, индуцируют гуморальный иммунный ответ и обеспечивают синтез более высокого уровня специфических антител 1:2400-1:3000 к 4-5 суткам после введения по сравнению с внутримышечным введением (7 суток - 1:600-1:1000). Повторная внутримышечная и внутриселезеночная ДНК-иммунизация через 15 суток после первого введения не привела к значительному увеличению титра антител.

Поскольку для получения МКА важно функциональное состояние иммунокомпетентных клеток нами изучено клеточное звено иммунного ответа на однократную ДНК-иммунизацию. Результаты определения общего содержания лейкоцитов в периферической крови, процентного и абсолютного содержания лимфоцитов, относительное содержание субпопуляций лимфоцитов, иммунорегуляторный индекс на 7 сутки после введения препаратов представлены в таблице 5.

Таблица 5

Показатели иммунного статуса мышей линии BALB/спосле введения рекомбинантной ДНК различными методами

Показатели	Норма	способ введения иммуногена	
		внутриселезеночное	внутримышечное
Лейкоциты, 10^9	9,8 -11,7	$\uparrow 15-16,1 \pm 0,17$	$\uparrow 14-16,5 \pm 0,17$
Лимфоциты %	42,3-48,5	$\uparrow 48-51 \pm 0,17$	$\uparrow 48-52 \pm 0,17$
CD 3, %	60-66,7	$60-65 \pm 0,17$	$60-62 \pm 0,17$
CD 4, %	47 – 52	$\uparrow 52-54 \pm 0,17$	$47-48 \pm 0,17$
CD 8, %	11-13	$\uparrow 28-34 \pm 0,17$	$\uparrow 35-37 \pm 0,17$
CD 20, %	11-12,7	$\uparrow 15-17 \pm 0,17$	$10-11 \pm 0,17$
CD 4/CD 8	>1	$2,8-3,4 \pm 0,17$	$2,5-3,2 \pm 0,17$
IgM, г/л	0,5-1,0	$\uparrow 1,8-1,2 \pm 0,17$	$0,7-0,9 \pm 0,17$
IgG, г/л	2,0-3,0	$\uparrow 5,0-8,3 \pm 0,17$	$2,0-2,8 \pm 0,17$

Фагоцитарный показатель %	40-50	$\uparrow 58-61 \pm 0,17$	$\uparrow 50-54 \pm 0,17$
----------------------------------	-------	---------------------------	---------------------------

Результаты, представленные в таблице 5 показали, что относительное количество активированных Т- и В-лимфоцитов при внутриселезеночной инъекции значительно выше показателей при внутримышечном введении, которое составило CD4 54/45%; CD20 17/10%.

Проведенные исследования показали, что введенные парентерально рекомбинантные ДНК обеспечивали стимуляцию и дифференциацию Т- и В-лимфоцитов селезенки. Также показано, что внутриселезеночная иммунизация обеспечивала на 3-4 сутки после введения препарата активацию В-лимфоцитов (CD20), CD4 Т-лимфоцитов, синтез антител изотипов IgM IgG, превышающие таковые при внутримышечной ДНК-иммунизации. Полученные результаты свидетельствуют, что в первые 7 суток введенная мышам рекомбинантная ДНК стимулировала развитие преимущественно иммунного ответа Th1 типа (увеличение относительного количества CD4;CD8 Т-лимфоцитов).

Наличие экспрессии мембранных дифференцировочных CD рецепторов на поверхности активированных иммунокомпетентных клеток определяли непрямой иммуноцитохимическим методом на основе МКА к CD рецепторам лимфоцитов (фирмы ООО «Сорбент» г. Москва), используя спленоциты мышей, иммунизированных рекомбинантными ДНК, кодирующими Gn, Gc вируса ЛДР.

Наличие на поверхности активированных В-лимфоцитов антиген-распознающих рецепторов определяли непрямой иммуноцитохимическим методом на основе иммуноглобулинов моноспецифической сыворотки к гликопротеинам Gn, Gc вируса ЛДР и антимышиного пероксиазного конъюгата. Для этого фиксированные гютаровым альдегидом мазки лимфоцитов обрабатывали культуральным антигеном вируса ЛДР в разведении 1:200 в течение 1 часа при температуре 37°C во влажной камере; дальнейшую постановку непрямого ТФ ИФА проводили согласно

общепринятой методике. В качестве субстрата использовали раствор 3-амино-9-этилкорбазола. Полученные результаты представлены на рисунке 7.

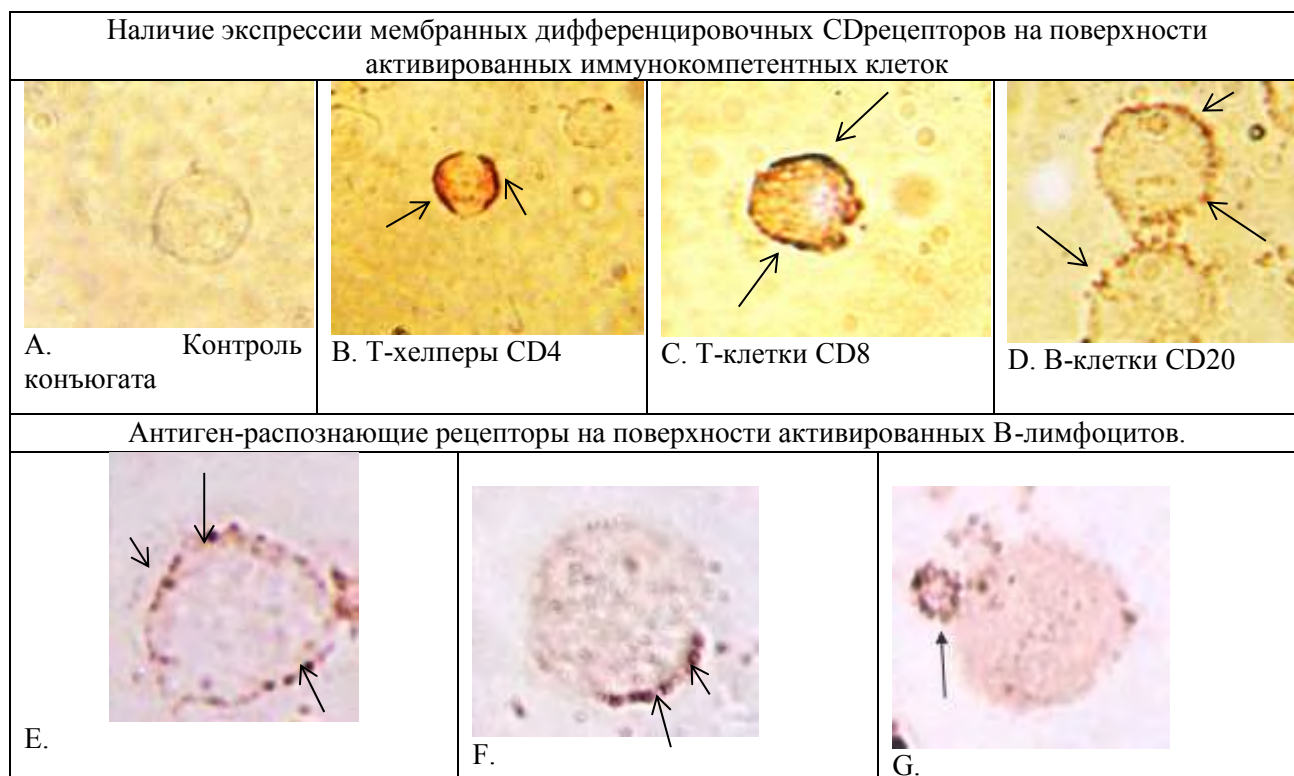


Рис. 7 – Выявление дифференцировочных CD рецепторов активированных Т- и В-лимфоцитов и специфической взаимосвязи антиген-антитело на поверхности активированных В-лимфоцитов (спленоциты мышей, иммунизированных плазмидами pCI-neo/Gc3/3, pCI-neo/Gn/2/2). (Пероксидазный ИЦХ метод ИФА, ув. x400 и x1000)

Результаты исследования, представленные на снимках рисунка 7 демонстрируют, что в первые 4-5 суток (срок наблюдения) после однократной ДНК-иммунизации выявлено наличие экспрессии дифференцировочных CDрецепторов на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитов(Рисунок 7 В, С, D) и наличие на поверхности активированных В-лимфоцитов антиген-распознающих рецепторов, выявляемое в виде красно-коричневого окрашивания мест их специфического взаимодействия со специфическим антигеном вируса ЛДР (Рисунок 7E-G).

Для проведения опыта гибридизации лимфоциты селезенки иммунной мыши отбирали на 3-4 сутки после последнего введения антигена, до полной дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки.

Опыты гибридизации клеток линии SP 2/0 Ag14.1 и спленоцитов мыши, однократно иммунизированной внутриселезеночной инъекцией ДНК-плазмиды pCI-neo/Gn/2/2 показали, что через 7-10 суток культивирования при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% влажности из 288 засеянных лунок в 245 лунках (81%) отмечено клонообразование, 118 (80%) из них оказались положительными в непрямом ТФ ИФА и РАЛ на основе рекомбинантного белка Gn вируса ЛДР, что свидетельствует о значительной иммуногенности плазмиды при ее внутриселезеночной инъекции. Изучение активности культуральных супернатантов полученных клонов гибридом и их изотипирование показало, что они специфически взаимодействовали как с рекомбинантным белком Gn, так и с антигеном поверхностных белков вируса ЛДР, однако относились в большинстве своем (64-70%) к классу IgM.

Положительные результаты получения моноспецифических сывороток (п. 4.1.1.2) и МКА к р30 вируса АЧС, используемого в качестве модели получения МКА к отдельному фрагменту белка, позволили применить разработанную схему иммунизации при получении МКА к гликопротеину Gn вируса ЛДР. Использована следующая схема, которая предусматривает этапы иммунизации мышей линии BALB/c, представленные в таблице 6.

Таблица 6

Схема иммунизации мышей линии BALB/c рекомбинантной ДНК, кодирующей гликопротеин Gn и рекомбинантным белком Gn вируса лихорадки долины Рифт

Кол-во введений	Интервал после первой иммунизации (сут.)	Способ и объем вводимого антигена		Кол-во вводимого белка (мкг)	Состав вводимого препарата	Титр антител (Log ₂ , n=3)
1	0	в/м в 4-главую мышцу бедра	0,5 см ³	50	pCI-neo/Gn/2/2 ЛДР в агарозном гидрогеле	1,0*
2	21	п/к в 4 места вдоль спины	0,5 см ³	100	RecGn на целлюлозе	5-6
3	35	в/бр	0,5 см ³	100	RecGn с неполным адъювантом Фрейнда	6-7
4	49-50	в/сел	0,1 см ³	25	pCI-neo/Gn/2/2RVF на 3ФР	7-8
	53-55	Сыворотка мыши – донора спленоцитов				8±0,5

Примечание: в/м – внутримышечное введение; п/к - подкожное введение в 3-5 точек, в/бр – внутрибрюшинное введение, в/сел – внутриселезеночное введение антигена, $\log_2^*$ - титры антител в ТФ ИФА; разведения сыворотки мышей, начиная с 1:50.

Результаты, представленные в таблице 6, свидетельствуют, что 4-кратная иммунизация мышей с интервалом 21 и 14 дней с использованием этапа праймирования рекомбинантной ДНК с последующим 3-кратным введением рекомбинантного белка Gn позволила получить адекватный гуморальный иммунный ответ. Динамика накопления специфических антител, представлена на рисунке 8.

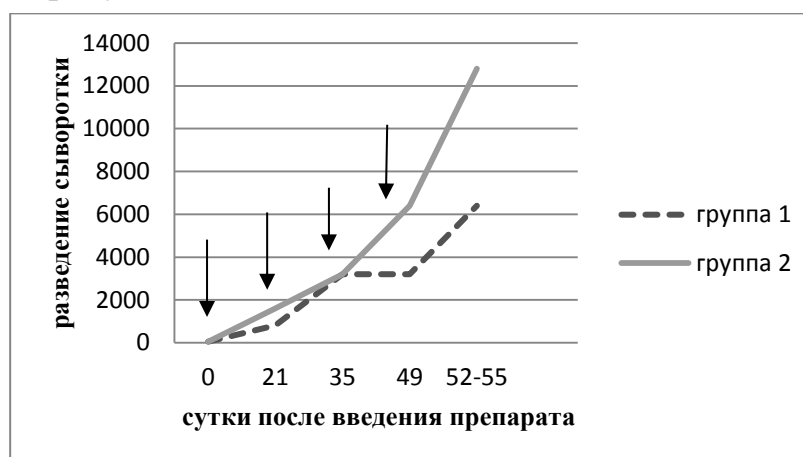


Рис. 8 -Динамика накопления специфических антител в результате иммунизации. Группа 1 –мыши, иммунизированные pCI-neo/Gn/2/2. Группа 2 –мыши, иммунизированные pCI-neo/Gn/2/2 а агарозном геле. Стрелками указаны сроки введения препаратов: на 0 день - ДНК-плазмиды; на 21; 35 и 49 день - рекомбинантного белка Gn.

Данные, представленные на рисунке 8, показывают, что рекомбинантная плазмидная ДНК индуцирует развитие гуморального иммунитета, о чем свидетельствует постепенное нарастание титра антител к синтезированному *in vivo* гибриднему белку Gn. Последующее введение очищенного рекомбинантного белка, полученного в прокариотической системе усиливает иммунный ответ. Также полученные данные показали, что введение рекомбинантной ДНК в составе агарозного гидрогеля стимулирует выработку более высоких титров специфических антител (рисунок 8, мыши группы 2).

Таким образом, как показали результаты исследований, представленные в данном разделе, отработанная схема иммунизации обеспечивала развитие

обоих путей иммунного ответа на введение иммуногена - синтез высокого уровня специфических антител и активацию иммунокомпетентных клеток.

Поскольку только 10-50% соматических клеток вовлекается в происходящий спонтанно процесс слияния [1; 10; 63; 93; 298], не факт, что большинство иммуноген-реактивных лимфоцитов сольется с клетками миеломы при их гибридизации. Для получения направленного слияния соматических клеток и увеличения процента образовавшихся гибридных клеток, способных продуцировать специфические МКА, нами проведены исследования эффективности сенсibilизации клеток миеломной линии Sp2/0-Ag14.1 рекомбинантным белком Gn перед опытом гибридизации.

Оптимальную концентрацию используемого белка для сенсibilизации подбирали эмпирически. Для этого клетки миеломной линии SP2/0-Ag14.1, прошедшие контроль на отсутствие ревертантов (культивирование в присутствии 8-азагуанина), отмывали средой RPMI-1640 без сыворотки, центрифугировали при 800 об/час 10 мин, осадок ресуспендировали и клетки сенсibilизировали рекомбинантным белком Gn из расчета 10,0; 20,0; 30,0 мкг/см³, инкубировали при 37°C в течение 30-40 мин. В CO₂ инкубаторе. Затем добавляли среду RPMI-1640 без сыворотки из расчета 1:3 и центрифугировали при 800 об/час 10 мин. Контроль адсорбции белка на поверхности клеток миеломы проводили методом непрямого ИЦХ ИФА с использованием гипериммунной сыворотки к вирусу ЛДР. Контроль на отсутствие спонтанной агглютинации клеток проводили под световым микроскопом. Результаты выявления сенсibilизированных клеток представлены на рисунке 9.

В результате проведенных исследований и как показано на рисунке 9 установлено, что адсорбция специфического антигена происходит на

поверхности миеломных клеток – наличие красно-коричневого окрашивания клеточной мембраны – места адсорбции рекомбинантного белка и взаимодействия его с антителами специфической сыворотки (рисунок 9В и С) и отсутствие специфического окрашивания на поверхности интактных клеток линии Sp2/0 (А).



Рисунок 9 - Иммунопероксидазное окрашивание клеток линии SP 2/0 Ag14.1, сенсibilизированных рекомбинантным белком Gn(ИЦХ ИФА, увеличение x400).

Гибридизацию соматических клеток осуществляли по стандартной методике Fazekas S. [228] с 50% ПЭГ 4000. Процедура процесса слияния подробно описана в «Методических рекомендациях по получению МКА к структурному белку р30 вируса АЧС ...» [Приложение 11].

Начало клонообразования отмечали на 5-7 сутки после гибридизации, которое зарегистрировано – в 432 лунках (75%) из рассаженных 576 лунок. Трехкратным скринированием в непрямом ТФ ИФА и РАЛ на основе рекомбинантного белка Gn определено, что в 357 (81%) лунках установлен положительный сигнал. В результате было отсажено более 1300 клонов.

Для скрининга антителопродукции клонами гибридом разработан экспрессный и чувствительный метод, обеспечивающий быстрое выявление специфических МКА в культуральной жидкости полученных клонов.

Используя факт наличия Ig рецепторов на поверхности гибридных клеток (лимфоцит+миелома), специфичных к антигенам иммуногена, нами изучена возможность использования частиц латекса, сенсibilизированных рекомбинантным белком Gn вируса ЛДР для предварительного скрининга

антителопродукции клонами гибридом при получении МКА к данному белку. В качестве носителя использовали латекс АКРОЛАР-к (ТУ-6-09-10-1824-88) – монодисперсные полиакролеиновые частицы, имеющие средний диаметр 5-7 мкм и концентрацию альдегидных групп 30 мкг моль/гр, окрашенные сафранином Т в розовый цвет (Институт биоорганической химии, Москва).

При разработке реакции латекс агглютинации (РЛА) подобраны оптимальные условия сенсibilизации рекомбинантными белками поверхности латексных частиц: их концентрация, иммобилизирующий буфер и режим иммобилизации. Сенсibilизация частиц латекса рекомбинантным белком заключалась в следующем: приготовленную 5% взвесь частиц латекса «нагружали» антигеном в соотношении 1:10 и выдерживали при температуре 37°C 2 часа или при 4°C - в 16-18 часов; к раствору очищенного рекомбинантного белка Gn с концентрацией 300 мкг добавляли 5% суспензию латекса до конечной концентрации 0,5% и инкубировали в 16-18 часов при 4°C. Оставшиеся свободные альдегидные группы блокировали 1% раствором глицина на 0,05М ФБР pH 7,2. Центрифугировали 10 мин при 10 тыс.g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в 50 mM растворе фосфатного буфера pH 7,2 с 1% БСА фракция V и инкубировали 30 мин при перемешивании. Трижды отмывали 50 mM раствором фосфатного буфера pH 7,2; сенсibilизированные частицы латекса ресуспендировали в 1 см³ буфера для хранения – 50 mM раствор фосфатного буфера pH 7,4 с 1% БСА и 0,1% NaN₃, 5% глицерина, хранили при 4°C до использования. Срок хранения полученного диагностикума без снижения активности составил 12 месяцев (срок наблюдения).

О сорбции антигена на поверхности частиц судили по агглютинации сенсibilизированных частиц латекса специфическими антителами сывороток к вирусу ЛДР. Для формирования доказательной основы способности экспрессного иммунохимического метода РЛА выявлять специфические антитела использовали одни и те же иммунореагенты в непрямом ТФ ИФА и сопоставляли их при анализе одной и той же выборки образцов. РЛА на основе

рекомбинантного белка проводили в планшетах для иммунологических реакций с U-образным дном или для иммуноферментного анализа (при детекции агглютинации под микроскопом). 10-25 мм³ тестируемой культуральной жидкости гибридом смешивали покачиванием с 10-25 мм³ нагруженных частиц латекса (время реакции 5-40 мин.). Реакция агглютинации частиц латекса хорошо видна невооруженным глазом на темном фоне или под малым увеличением инвертируемого микроскопа. На снимках рисунка 10 представлены результаты использования реакции латексагглютинации при проведении скрининга антителопродукции клонами гибридом.

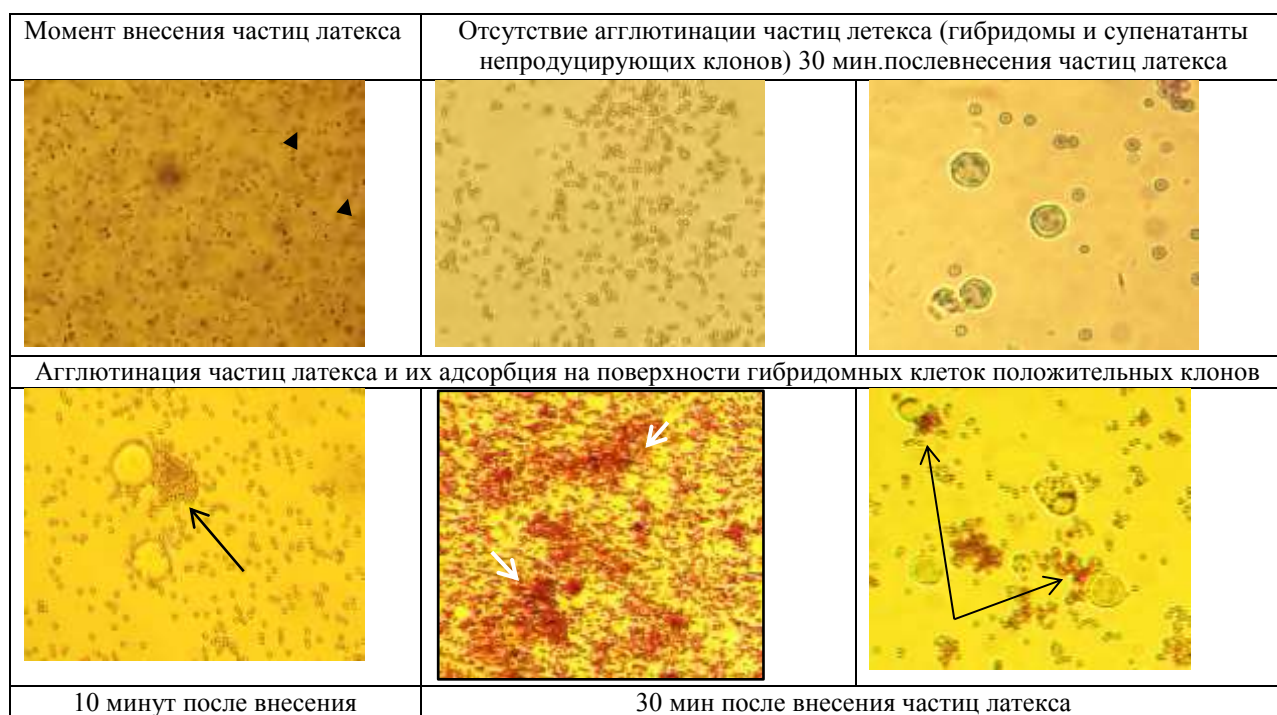


Рис. 10- Определение чувствительности и специфичности РЛА для оценки антителопродукции клонами гибридом. (Увеличение x400и x900).

Полученные данные специфичности и чувствительности разработанного метода РЛА на основе рекомбинантного белка наглядно представленные на рисунке 10, свидетельствуют о возможности его использования для быстрого предварительного анализа антителопродукции клонами гибридом и их селекции.

Метод также апробирован при оценке секреции гибридомами МКА к р30 вируса АЧС и сопоставлен с традиционным непрямым ТФ ИФА.

Результаты латекс-агглютинации на $98 \pm 0,24\%$ ($p < 0,05$) совпадали с результатами непрямого ТФ ИФА. Преимуществом предлагаемого метода является быстрота и простота постановки реакции, а также экономия реагентов, что особенно важно при первичном скринировании антителопродукции полученными гибридами.

Клонирование полученных гибридом и изучение иммунохимических свойств МКА к гликопротеину Gn вируса ЛДР

Основная потеря хромосом гибридами происходит в течение первого месяца после слияния. Раннее клонирование является основным методом получения клонов гибридных клеток, стабильно продуцирующих специфические МКА. После появления четко различимых клонов, начиная с 5-7 суток, гибридомы с заданным спектром реагирования трехкратно клонировали методом предельных разведений и в полужидком агаре на фидерном слое перитонеальных макрофагов по общепринятой методике [35; 36; 63; 90; 93].

В результате проведения селекции гибридом на среде НАТ/НТ; клонирования и скринирования в непрямом ТФ ИФА против трех антигенов – рекомбинантный белок Gn, сахарозо-ацетоновый антиген (САА) вируса ЛДР и лизата *E. Coli* для дальнейшей работы по изучению иммунохимических свойств полученных МКА отобрано 12 клонов гибридом, продуцирующих МКА к гликопротеину Gn (4B4; 5C12; 5H1; 4H3; 2H4; 2F12; 3A9; 4A5; 4G6; 1A7; 1H5; 1A9). Культуральные жидкости отобранных клонов положительно реагировали в непрямом ТФ ИФА с очищенными рекомбинантным белком Gn и САА вируса ЛДР и не взаимодействовали с лизатом *E. coli*. Определение специфичности полученных МКА к конформационным эпитопам проводили в непрямом ТФ ИФА на основе денатурированного 2% SDS культурального антигена вируса ЛДР. В результате – из 12 исследованных клонов МКА 5 клонов (4B4; 5H1; 4H3; 1A7; 4G6) реагировали и с нативным, и с денатурированным антигеном вируса. МКА остальных 7 клонов взаимодействовали только с нативным вирусным

антигеном. В результате отобраны клоны 4В4; 5С12; 4А5; 2Н4, которые не утрачивали индекс пролиферации 9,6-9,8 в течение 10-15 кратных пересевов с коэффициентом 1:3 каждые. По уровню и стабильности продукции МКА, пролиферативным свойствам отдано предпочтение клонам 4В4; 5С12; 4А5; 2Н4. Нарращивание клеточной массы для получения препаративных количеств МКА проводили *in vitro* на бессывороточной среде (фирмы Aldrich Sigma) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 2-5% ФСТ. Иммуноглобулины МКА выделяли и очищали осаждением сульфатом аммония по общепринятой методике, иммуноглобулины конъюгировали с пероксидазой хрена перийодатным методом по Tijssene P. [570].

Результаты определения полипептидной специфичности полученных МКА к гликопротеину Gn представлены на рисунке 11.

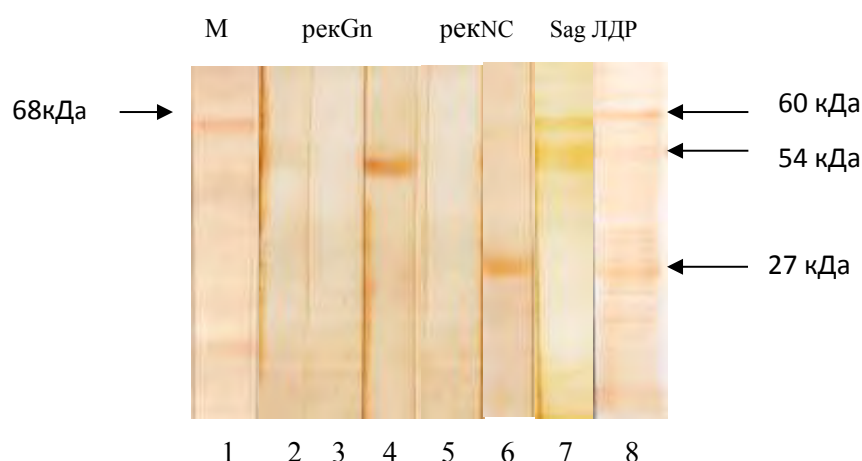


Рис. 11 – Специфичность МКА к структурным белкам вируса ЛДР.

1 – маркер; 2 – нормальная ИАЖ мышей; 4,5 - МКА клона 4В4 к гликопротеину Gn; 3, 6 - МКА клона 2В11 к нуклеокапсидному белку (NC); 7 – сыворотка мышей к гликопротеинам Gn/Gc; 8 - сыворотка мышей к вирусу ЛДР.

Результаты изучения иммунохимических свойств полученных МКА показали, что они специфичны к антигенным детерминантам гликопротеина Gn вируса ЛДР: реагировали с САА, очищенным культуральным антигеном вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ», рекомбинантным белком Gn и не вступали в реакцию с рекомбинантным нуклеокапсидным белком (NC) вируса ЛДР.

Результаты вестерн-блоттинга показали специфичность МКА клона 4В4 к гликопротеину Gp, которые выявляли белок с молекулярной массой 54 кДа, соответствующий по м.м. негликозилированному гликопротеину Gp. Моноклональные антитела клонов 5С12; 4А5; 2Н4 взаимодействовали только с нередуцированным белком, то есть они были специфичны к конформационным эпитопам гликопротеина [Приложение 17]. О чем также свидетельствуют результаты ИЦХ ИФА в чувствительной культуре клеток, инфицированной вирусом ЛДР (Рисунок 15 F).

Таким образом, результаты исследований показали, что моноклональные антитела, полученные при иммунизации ДНК-конструкциями и рекомбинантными белками способны высокоспецифично распознавать и связываться с антигенными детерминантами соответствующих вирусных белков в различных видах иммунологического анализа, таких как иммуноблотт, иммуноцитохимический анализ, различные варианты ТФ ИФА (непрямой, конкурентный). К тому же не было обнаружено перекрестной реактивности с антигенами гетерогенных вирусов. Проведенные исследования в ходе выполнения данного раздела позволили усовершенствовать отдельные ключевые этапы технологии получения линий гибридных клеток, стабильно секретирующих специфические МКА (таблица 7) и разработать схему технологии получения МКА заданной узкой специфичности к антигенам с известной нуклеотидной (аминокислотной) последовательностью, представленной на рисунке 12.

Таблица 7

Совершенствование отдельных ключевых этапов технологии получения МКА направленной узкой специфичности

Этап получения МКА	Традиционный	Усовершенствованный	Результаты
Иммунизация	Использование концентрированного очищенного вирусного антигена, отдельных вирусных белков	Использование ДНК-конструкций, несущих ген целевого белка и соответствующий рекомбинантный белок	Синтез гибридного белка <i>in vivo (in situ)</i> ; правильный фолдинг и посттрансляционные модификации белковой молекулы; получение высокоактивных антител и активированных В-

			лимфобластов
Получение иммунных лимфоцитов	Использование гомогенизатора	Перфузия спленоцитов питательной средой	Отсутствие негативного механического воздействия на клетки
Гибридизация		Сенсибилизация клеток миеломной линии Sp2/0 соответствующим рекомбинантным белком	Обеспечение направленного слияния сенсибилизированных опухолевых клеток и активированных В-лимфобластов
Скрининг антитело продукции	Использование различных вариантов ТФ ИФА на основе концентрированных очищенных вирусных антигенов	Кроме стандартных методов использование непрямого ТФ ИФА, реакции латексагглютинации на основе рекомбинантного белка, ИЦХ ИФА	Упрощение процедуры скрининга, сокращение времени, возможность отбора МКА к конформационным эпитопам антигена; использование min количеств реагентов

Проведенные исследования показали, что метод ДНК-иммунизации и стратегия гетерогенной прайм-бустерной иммунизации мышей позволяет получить в короткие сроки (2-3 месяца) стандартизованные МКА, направленные к эпитопам полноразмерного белка гликопротеина Gn вируса ЛДР. Изученные морфологические и культуральные свойства полученных гибридом; основные иммунохимические свойства моноклональных антител не отличались от таковых полученных с использованием традиционных вирусных антигенов. Преимущества и эффективность получения положительных клонов гибридом с использованием разработанной схемы получения гибридом представлены в таблице 8.

Таблица 8

Эффективность клонообразования при различных схемах иммунизации

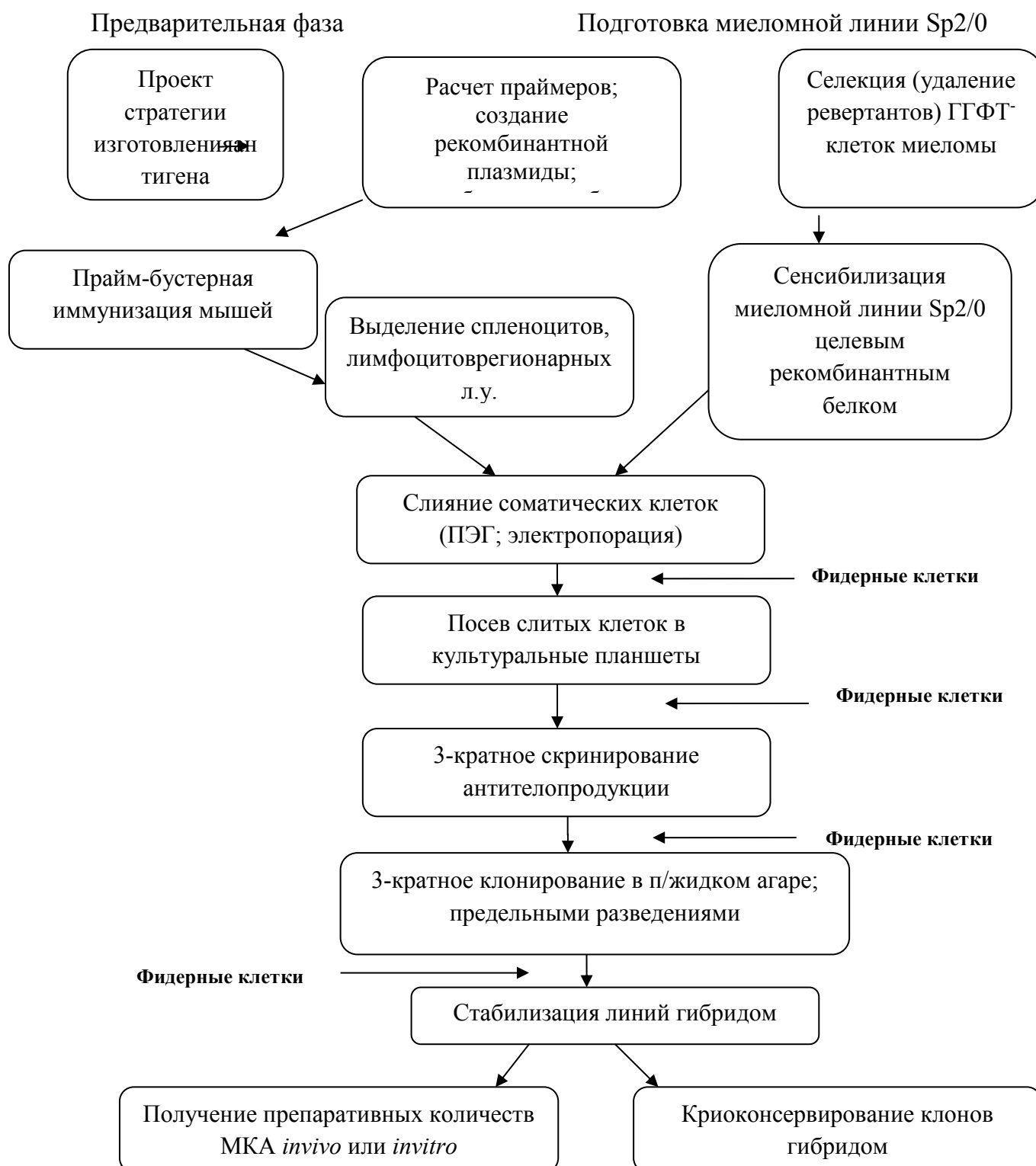
Результаты гибридизации соматических клеток	Иммунизация			
	рекДНК/рекомбин. белок р30 вируса АЧС**	рекДНК/рекомбин. белок Gn вируса ЛДР	Антиген поверхностных белков Н5 ВГП*	Концентрированный антиген вируса ЛДР***
Всего лунок с колониями гибридом	403	438	369	185
Лунок с колониями продуцирующими специфич. МКА	298	357	78	82
% клонообразования	63	75	57	50
Выход положительных клонов (%)	74	81	20	44

Примечание: *Данные Жиангеровой О.В. [21]; **Першина А.С. [57]; ***Колосовой М.В. [27]

Получение высокоспецифичных МКА к генетически охарактеризованному полипептидному продукту открывает широкие

возможности их использования для изучения: тонкой структуры вирусов и особенности их репродукции; иммунохимического и функционального анализа отдельных белков вирусов; антигенности рекомбинантных белков и их экспрессии, а также разработки диагностических иммуноферментных тест-систем.

Схема технологии получения МКА заданной узкой специфичности



4.2. Разработка методов ранней диагностики лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Экстренная и надежная диагностика особо опасных инфекционных болезней (грипп и болезнь Ньюкасла) в том числе экзотических (ЛДР) является одним из неперенных условий борьбы с ними. Ценность методов лабораторной диагностики определяется их чувствительностью, специфичностью и временем постановки реакции при обнаружении специфических антигенов и антител непосредственно в пробах.

В настоящее время в диагностике инфекционных болезней развиваются два взаимодополняющих основных направления. Это генетическая диагностика, основанная на выявлении нуклеиновой кислоты возбудителя и иммунодиагностика, базирующаяся на выявлении специфических антигенов и антител.

4.2.1. Методы молекулярной диагностики лихорадки долины Рифт и гриппа птиц H5N1

Высококочувствительные и специфичные методы современной молекулярной биологии позволяют оперативно выявлять, количественно определять геном возбудителя инфекционной болезни и уровень его патогенности, а также проводить его дифференциацию от возбудителей других болезней. В период виремии вирус может быть выявлен в сыворотке и плазме крови, патологическом материале при вскрытии: селезенке, печени, мозге, а в случае ЛДР – абортнрованном плоде, околоплодных водах и оболочках.

С этой целью нами совместно с коллективом авторов (Жигалева О.Н. и др., 2006) по результатам анализа нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса гриппа подтипов H5 и N1, имеющихс в базе данных GenBank (USA) разработаны ОТ ПЦР с электрофоретической детекцией на основе рассчитанных праймеров, комплементарных консервативным участкам гена NP, HA5 и N1. Результаты определения специфичности разработанных ОТ ПЦР показали, что рассчитанные праймеры

комплементарные гену NP четко гибридизуются с РНК вируса ГП различных подтипов. Праймеры, комплементарные консервативным участкам гена гемагглютиниона пятого подтипа и N1 гибридизуются с РНК вирусов только соответствующего подтипа, не вступая в реакцию с РНК вирусов гетерологичных подтипов. Таким образом, разработанные ОТ-ПЦР позволили выявлять в инфицированном материале геном вируса гриппа птиц, подтиповую принадлежность к H5 и N1, а также дифференцировать вирус H5N1 от других подтипов вируса гриппа птиц [Приложение 1 и 2].

Для разработки двухраундовой ОТ-ПЦР с наружными и гнездовыми праймерами совместно с Хухоровой И.Ю. и соавтор. (2008) на основе анализа имеющихся в базе данных GenBan (USA) нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса ЛДР были подобраны праймеры комплементарные участку S-сегмента РНК, расположенные в нуклеотидных позициях с 203 по 818 нуклеотид (прямой-внешний E-31 и обратный – внешний E-32) и 388 по 670 нуклеотид (прямой-внутренний E-33 и обратный-внутренний E-34), ограничивая продукты амплификации размером 615 п.о. и 285 п.о., соответственно. Рассчитанные пары праймеров позволили синтезировать специфический ПЦР-продукт.

Для оценки специфичности разработанной ПЦР использованы различные препараты РНК вируса ЛДР и гетерологичных вирусов, возбудителей болезней жвачных животных. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9

Выявление геномной РНК в пробах органов и тканей животных и лизатах клеток, инфицированных вирусом ЛДР и гетерологичными вирусами

№ проб	Наименование препаратов РНК	Инфекционная активность (n=3)	Наличие вирусного генома (n=3)
1	РНК, выделенная из культурального вирусного материала, штамм «1974-ВНИИВВиМ» вируса ЛДР, (3 пассаж ПС)	7,25±0,07 lgТЦД _{50/мл}	+
2	РНК, выделенная из культурального вирусного материала, штамм «RVF(s)113» вируса ЛДР, (3 пассаж)	6,5±0,04 lgТЦД _{50/мл}	+

	ПС);		
3	РНК, выделенная из 10% суспензии мозга мышей, зараженных вирулентным штаммом «Энтеббе» вируса ЛДР;	$6,33 \pm 0,071 \text{lg}$ MICLD _{50/мл}	+
4	РНК, выделенная из 10% суспензии органного материала мышей (печень), зараженных вирулентным штаммом «Энтеббе» вируса ЛДР;	$8,5 \pm 0,061 \text{lg}$ MLD _{50/мл}	+
5	РНК, выделенная из культурального вирусного материала (ПСГК), вирус блютанга серотип 4	$6,5 \pm 0,041 \text{lg}$ ТЦД _{50/мл}	-
6	РНК, выделенная из 10% суспензии мозга мышей, штамм ММ вируса Найроби (156 пассаж на мышах);	$6,0 \pm 0,05 \text{lg}$ MLD _{50/мл}	-
7	РНК, выделенная из 10% суспензии мозга мышей, штамм «В 8935» вируса Акабане	$6,7 \pm 0,031 \text{lg}$ ТЦД _{50/мл}	-
8	РНК, выделенная из лиофилизированного материала вируса ЧМЖ (шт. «45g35» 3 пассаж ПС);	$5,5 \pm 0,071 \text{lg}$ ТЦД _{50/мл}	-
9	РНК, выделенная из лиофилизированного препарата вируса парагриппа-3 КРС (штамм ПГ/К 2002, 3 пассаж ПС);	$6,5 \pm 0,02 \text{lg}$ ТЦД _{50/мл}	-
10	Общий пул РНК, выделенной из пробы 10% суспензии интактной печени КРС	-	-

Примечание: «+» и «-» соответственно, наличие или отсутствие вирусного генома в пробе

Приведенные в таблице 9 данные свидетельствуют о том, что разработанная двухраундовая ОТ-ПЦР с наружными и гнездовыми праймерами высокоспецифична, так как не было выявлено наличие амплификатов при использовании в качестве матрицы нуклеиновых кислот других представителей буньявирусов или гетерологичных вирусов, возбудителей болезней овец. Установлено, что ОТ-ПЦР позволяет устойчиво амплифицировать фрагменты *ns*-гена на матрице РНК, выделенной из инфицированных материалов; идентифицировать эпизоотический штамм «Энтеббе» и аттенуированные штаммы «1974-ВНИИВВиМ» и «RVF(s)113» в пробах инфицированных органов, тканей и культур клеток, имеющих минимальный титр инфекционной активности –10 ТЦД_{50/мл}. [Приложение 3]

Разработка тест-системы для выявления геномов вирусов болезни Найроби и лихорадки долины Рифт методом мультиплексной ОТ - ПЦР в режиме реального времени

Перекрестная реактивность в серологических реакциях, не позволяющая надежно дифференцировать представителей семейства *Bunyaviridae*, общность чувствительных сельскохозяйственных животных, экзотичность для нашей

страны, стремительное дальнейшее территориальное распространение за пределы континента так называемых «африканских лихорадок» определило необходимость создания системы дифференциальной молекулярной диагностики болезней, вызванных вирусами данного семейства.

Основным требованием формата «мультиплекс» является сохранение аналитической чувствительности в отношении каждого из возбудителей в условиях избытка другого. Подобное условие выполнимо при использовании ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Совместно с Сальниковым Н.Г. и соавторами (2012) разработана мультиплексная ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Помимо праймеров к фрагментам РНК S-сегмента вируса ЛДР и М-сегмента вируса болезни Найроби реакционная смесь содержала гибридизационные зонды, включающие различные флуоресцентные метки: для детекции ЛДР - флуороформ Fam, для болезни Найроби - Rox. Для контроля качества выполнения теста был введен внутренний контрольный образец (ВКО), зонд которого мечен флуороформом Cy5. Разработанная тест-система позволила выявлять в пробах инфицированного материала (органов, тканей и культур клеток) геномы вирусов ЛДР и болезни Найроби. Специфичность метода оценивали путем исследования препаратов РНК вирусов ЛДР, болезни Акабане и болезни Найроби, а также препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из интактных образцов. В результате проведенных исследований установлено, что праймеры и зонд, комплементарные геному вирусов ЛДР и болезни Найроби не взаимодействовали между собой и другими представителями семейства *Bunyaviridae*. Аналитическую чувствительность предложенной мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени определяли в модельных экспериментах, исследуя препараты РНК, выделенные из последовательных десятикратных разведений образцов культуры клеток почки сайги (ПС), инфицированной вирусом болезни Найроби (штамм ММ/К-05) и ЛДР (штамм «RVF 2002/09-ПС»). Рассчитанное значение аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для вируса

болезни Найроби составило $2,2 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, для вируса ЛДР - $2,5 \pm 0,3 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$. [Приложение 6 и 7]

Разработанные методы ПЦР-диагностики являются высокоспецифичными и чувствительными методами. Однако кратковременная виремия (5-6 дней) при ЛДР ограничивает применение методов ПЦР-диагностики. Максимальновирусная РНК может быть выявлена в течение двух недель после заражения [54; 140; 216; 217; 245; 322].

Для раннего обнаружения антигенов вирусов приемлемы методы ИФА различных форматов, так как являются быстрыми, чувствительными, специфичными и безопасными; в реакции используются инаktivированные или рекомбинантные антигены. Раннее выявление специфических антигенов изучаемых вирусов и антител к ним обеспечивается особенностью цикла репродукции – ранним появлением вирусных антигенов в тканях, выделениях и крови инфицированных животных.

4.2.2. Использование моноклональных антител и рекомбинантных белков для индикации и идентификации антигенов вирусов лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, и болезни Ньюкасла

Целью данного раздела исследований являлось разработка и совершенствование методов диагностики особо опасных зооантропонозов с учетом имеющейся реагентной базы – полученных МКА и рекомбинантных белков.

Учитывая наличие у вирусов гриппа А и ЛДР одноцепочечной минус нити РНК, сегментированность генома, схожесть функций отдельных структурных белков вирусов, высокую опасность вируса ЛДР, ограничивающую проведение отдельных этапов экспериментальных работ, нами использован вирус гриппа А и болезни Ньюкасла в качестве модели при разработке средств ранней диагностики данных болезней.

4.2.2.1. Разработка метода иммуноцитохимического анализа для обнаружения и дифференциации возбудителей лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Для разработки высокочувствительного иммуноцитохимического метода ИФА выявления вирусных антигенов использовали перевиваемые культуры клеток CV-1, ПСГК, ПС, чувствительные к изучаемым вирусам и МКА к нуклеопротеину вирусов гриппа А, болезни Ньюкасла, ЛДР; к гликопротеину G_n вируса ЛДР.

Согласно рекомендациям МЭБ, выделение вируса гриппа птиц и болезни Ньюкасла из клинического и патологического материалов проводят на 9-10-суточных СПФ развивающихся эмбрионах кур (СПФ РЭК), с дальнейшей идентификацией вируса в РТГА, РН и РДП. Схожесть клинических и патологоанатомических признаков этих болезней, общность лабораторной модели выделения вируса (СПФ РЭК) осложняет их дифференцирование. При выборе мероприятий по профилактике и ликвидации болезни также возникает необходимость идентифицировать изолят как вакцинный (слабопатогенный) или вирулентный (высокопатогенный). Тем более важно разграничить в хозяйстве циркуляцию вирулентного штамма на фоне вакцинированного стада. Одним из решений проблемы является применение перевиваемых культур клеток для выявления специфических антигенов и изоляции вируса.

Тест-системы экспресс-диагностики болезней на основе МКА к антигенным детерминантам внутренних структурных белков являются достаточно надежными, так как они, в отличие от наружных полипептидов, являются наиболее консервативными и, соответственно, перспективными для разработки тест-систем диагностики вирусных болезней. Возможность раннего выявления специфических антигенов вирусов обуславливается тем, что в первые 8-22 часа после инфицирования (в зависимости от возбудителя, 8-12 часов для гриппа птиц и болезни Ньюкасла и 10-22 часа для ЛДР) происходит завершение цикла репродукции вирусов, сопровождающееся

накоплением в клетке полного набора вирусных белков, что обеспечивает экспрессность метода диагностики.

Целью исследований данного раздела явилось усовершенствование методов ранней лабораторной диагностики гриппа, болезни Ньюкасла и ЛДР с использованием перевиваемых культур клеток и соответствующих моноклональных антител.

Широкий спектр клеточного тропизма вирулентных штаммов вирусов обуславливается гетерогенностью их популяции, приводящей к быстрой селекции вариантов даже после первого пассажа. Этот факт может служить дополнительным тестом определения вирулентности изучаемого изолята (штамма). Линия клеток MDCK чувствительна к вирусу гриппа, независимо от степени вирулентности штамма, который накапливается в пределах 4,75 - 6,25 lg ТЦД₅₀/см³. Культура клеток ПСГК обладает различной степенью чувствительности к исследуемым штаммам, зависящей от типа и штамма вируса.

В чувствительных культурах клеток размножение вирусов высоковирулентных (велогенных) штаммов отмечали без проведения пассажей адаптации. ЦПД, обусловленное размножением вируса гриппа, характеризовалось поражением значительной части клеток с выраженными морфологическими изменениями в виде вакуолизации цитоплазмы, образования симпластов и многоядерных синцитиев, появления округлых зернистых клеток, количество которых увеличивается по мере удлинения сроков инкубации, с последующим деструкцией монослоя. При культивировании велогенного штамма ПМВ1- "Т-53" и изолятов вируса (голубь, цыпленок и дикий лебедь) болезни Ньюкасла в культуре ПСГК отмечали ярко выраженную деструкцию клеточного монослоя в виде образования симпластов и многоядерных синцитиев (рисунок 13 и 14).

В культурах клеток, инфицированных слабовирулентными штаммами вируса гриппа, его репродукция была более длительной и без разрушения клеточного монослоя. Отмечали усиление пролиферации клеток и выявление

вирусных антигенов в немногих отдельных, более чувствительных к нему клетках. Деструктивные изменения в культуре клеток ПСГК, зараженной лентогенным штаммом ПМВ1- Ла-Сота, были слабо выражены (в виде округления клеток) или вообще не отмечали изменений в течение 3-5 суток культивирования (Рисунок 14).

В культурах клеток ПС, CV-1, чувствительных к вирусу ЛДР, отмечали на ранних стадиях культивирования пролиферативные свойства вируса, а также образование симпластов и многоядерных синцитиев, появление округлых клеток с последующей деструкцией монослоя. Видимое под световым микроскопом цитопатическое действие вируса ЛДР отмечается не ранее 24-36 часов, а к 48-72 часам большинство клеток были дегенерированы. Результаты проявления цитопатического действия вируса ЛДР представлены на рисунке 13.

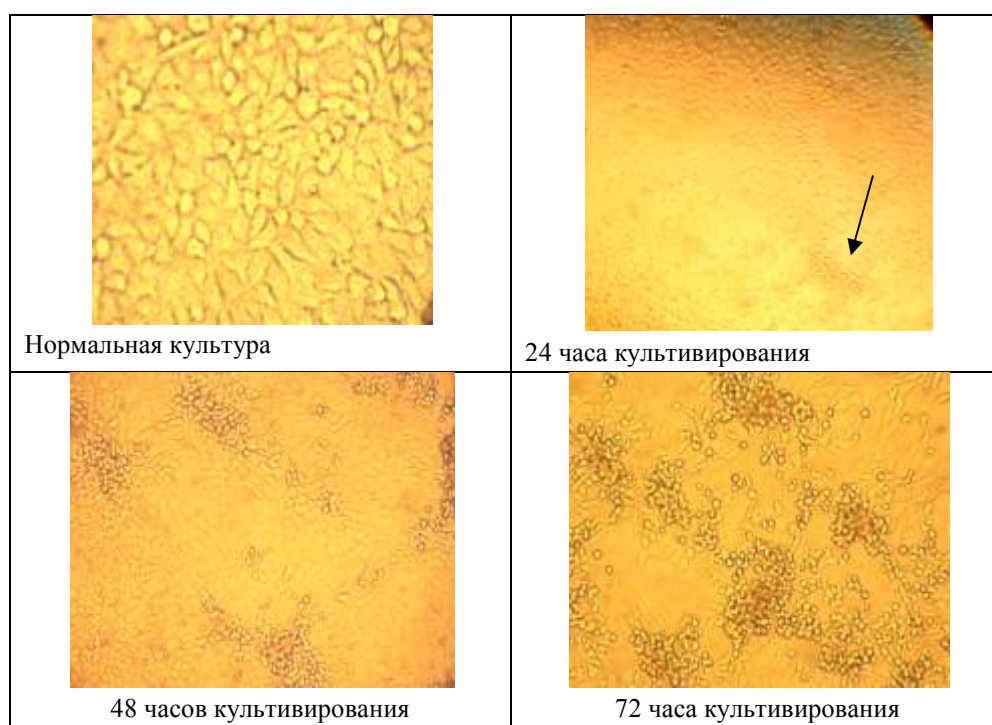


Рис. 13 –Динамика развития ЦПД вируса ЛДР. Увелич. х400

Нами проведено сравнительное изучение репродукции и накопления вирусов (изолятов) эталонных штаммов гриппа птиц и болезни Ньюкасла в культуре клеток ПСГК и развивающихся эмбрионах кур в зависимости от степени их вирулентности, результаты которого представлены в таблице №10.

Таблица 10

Инфекционная и антигенная активность вирусосодержащего материала при культивировании вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла в различных системах

Наименование штамма			Титры инфекционной и антигенной активности (n=3)				Разница lg ЭЛД _{50/см³} /lg ТЦД _{50/см³}
			ЭЭЖ КЭ (lgЭЛД _{50/см³})	ЦПД (lgТЦД _{50/см³})	ИЦХ ИФА (lgТЦД _{50/см³})	РГА ЭЭЖ/культ.ж ГAE/см ³	
ВГП	А/утка/Н5N2		7,5±0,5	5,25±0,4	5,75±0,2	128-256/32-64	2,0-1,75
	А/крачка/ Н5N3		7,0±0,4	3,5±0,1	3,7±0,4	256/64-158	4,0-2,5
	А/кур./Н5N1		8,0±0,6	6,7±0,2	6,5±0,5	64-128/32-64	1,5-1,0
	А/утка/ Н1N1		7,0±0,5	3,5±0,4	3,0±0,5	512/16-32	4,0-3,5
	А/цыпл./ Н7N7		8,0±0,3	6,75±0,7	7,2±0,6	256-512/32	1,5-1,0
	А/цыпл/Н9N2		7,0±0,5	5,5±0,6	5,0±0,5	512/32-64	2,0-1,5
	Изолят (цыпленок)*		7,5±0,4	5,8±0,1	6,2±0,3	256/16-32	2,0-1,5
ПМВ1 ВБН	Т-53	II генотип	7,5±0,7	6,5±0,5	5,5±0,2	1024/128-256	2,0-1,0
	Ла- Сота		8,5±0,5	отсутствует	не выявляется	512-1024/0	8,5
	Изолят (голубь)* IV генотип		8,0±0,3	5,5-6,5	6,0±0,3	253/64-128	2,0-1,5
	Изолят (голубь)* VI генотип		8,5±0,2	6,5±0,3	7,0±0,1	512-1024/256	2,0-1,5

Примечание: * - результаты подтверждены ОТ ПЦР и выделением соответствующих вирусов гриппа птиц H5N1 и болезни Ньюкасла

Представленные в таблице 10 данные свидетельствуют о том, что при культивировании вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла штаммы которых, отличаются по вирулентности, отмечены различия титров инфекционной активности, определенных на СПФ РЭК и в культуре клеток: для вирулентных (велогенных) штаммов различия значений составляли не более 1,5-2,0 lg ЭЛД_{50/см³}; для низкопатогенных (лентогенных) штаммов разница в титрах составила более 3 lg ЭЛД_{50/см³}.

Изучение репродукции вирусов методом визуального выявления их антигенов в инфицированных клетках является одним из наиболее информативных методов ранней диагностики. Он позволяет не только обнаруживать вирусные антигены, но и по характеру окрашивания субстрата в зараженных клетках сделать заключение о репродукции определенных вирусных белков в различных структурах клетки. В реакции оценивается не

только наличие сигнала (наличие или отсутствие специфического окрашивания) и его сила (интенсивность), но и пространственное распределение сигнала в препарате (окраска мембран, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов клеток - места локализации антигена), а также с большей достоверностью происходит идентификация конкретного возбудителя инфекции.

Репродукцию структурных вирусных протеинов в инфицированных клетках изучали методом прямого ИЦХ ИФА на основе конъюгата МКА к соответствующему вирусу, выявляющих наличие соответствующих антигенных детерминант вирусных белков в инфицированных клетках.

Установлено, что в местах специфического связывания пероксидазных конъюгатов МКА с соответствующими антигенами отмечается характерное специфическое красно- или желто- коричневое диффузное или в виде гранул окрашивание цитоплазмы, ядра или перинуклеарной зоны зараженных клеток. В неинфицированных клетках или клетках, инфицированных гетерологичным вирусом (подтипом) подобного окрашивания не отмечали. Результаты проведенных исследований подтверждали реакцией гемадсорбции эритроцитов цыплят в культуре клеток (грипп птиц), непрямым ТФ ИФА со специфической моновалентной гипериммунной сывороткой к соответствующему типу (подтипу) вируса.

Результаты специфического взаимодействия антител и антигенов вирусов гриппа птиц, болезни Ньюкасла и ЛДР представлены на рисунке 14.



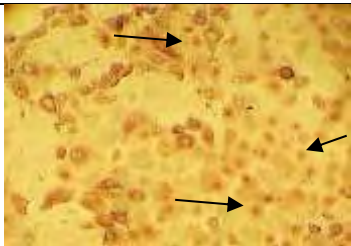
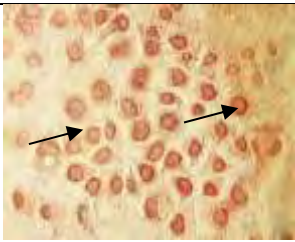
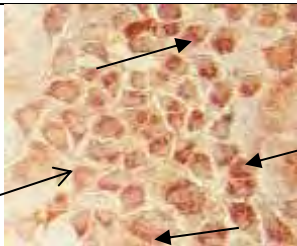
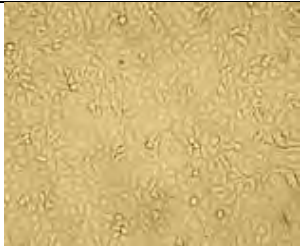
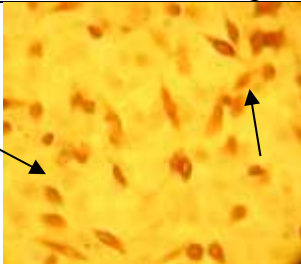
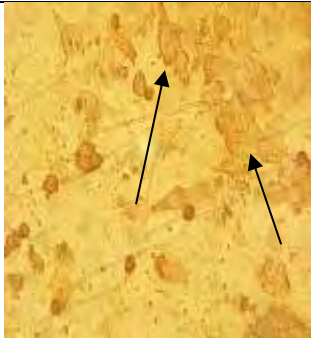
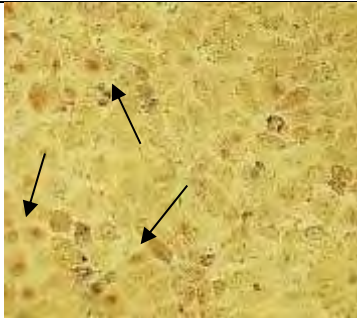
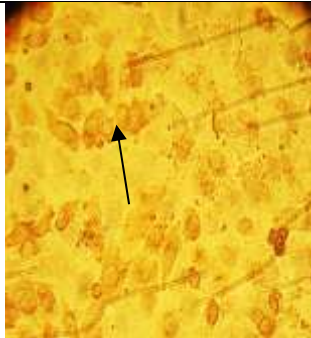
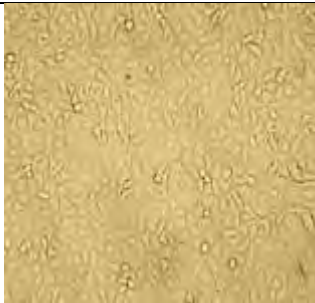
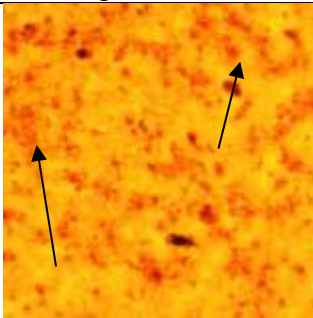
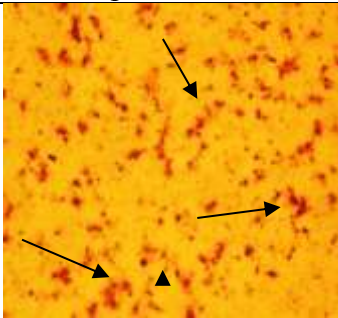
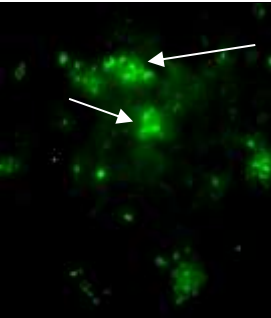
			
D. Специфическая сыворотка к ЛДР (выявление внутриядерной локализации белка NSs. 8-10 часов после заражения)	E. Моноспецифическая сыворотка к Gn/Gc 12-14 часов после заражения	F. МКА к Gn18-24 часа после заражения.	
Выявление АГ детерминант гликопротеинов вируса ЛДР			
Выявление антигенных детерминант вируса ВГП в культуре клеток ПСГК через 10-18 часов после заражения			
			
G. контроль антивидового конъюгата в культуре клеток ПСГК	H. МКА к NP (низкопатогенный ВГП)	I. МКА к NP (высокопатогенный ВГП)	
Выявление антигенных детерминант вируса НВ в культуре клеток ПСГК через 12-18 часов после заражения			
			
K. МКА к NP вируса (велогенный штамм Т-53), 24 часа после заражения	L. МКА к NP вируса (лентогенный штамм Ла Сота), 72 часа после заражения	M. МКА к NP вируса (изолят голубь), 24 часа после заражения	
Выявление антигенных детерминант вируса АЧС в культуре клеток CV-1 через 24-36 часов после заражения			
			
N. контроль антивидового конъюгата	O. Гипериммунная сыворотка к вирусу АЧС	P. МКА 7F7 к p30 АЧС	Q. ФИТЦ МКА 7F7 (к p30 вируса АЧС)

Рис. 14-Выявление антигенных детерминант структурных белков на ранних стадиях репродукции вирусов особо опасных инфекций.

Методом флуоресцирующих антител и пероксидазным методом ИФА удавалось выявить антигены вируса ЛДР через 10-18 часов после заражения, через 24-36 часов число клеток со специфическим свечением (окрашиванием) значительно увеличивалось. Антиген гликопротеина обнаруживали в перинуклеарной зоне или в виде образований, расположенных с одной стороны цитоплазмы (полярное окрашивание). Через 48 часов все клетки содержали специфический антиген.

Результаты электронной микроскопии клеток линии ВНК-13/21 инфицированной вирусом ЛДР, представленные на рисунке 15, подтверждают данные ИЦХ в культуре клеток.



Рис. 15- Электронная микроскопия клеток, инфицированных вирусом ЛДР штамм «Энтеббе». Негативное контрастирование, увеличение 100х 1000 (Пономарев В.Н.; Гусев Н.Г.)

Проведенные исследования показали, что вирионы вируса ЛДР не удалось обнаружить в ядре инфицированных клеток. Зрелые вирусные частицы обнаруживали только в цитоплазме, внутри многочисленных вакуолей и цистерн эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Вирионы находились свободно или в связи с клеточными мембранами и при

выходе из клетки не приобретали дополнительной оболочки, так как по форме и размерам не отличались от внутриклеточных вирусных частиц. Внутриядерные филаменты неструктурного белка выявляли только на ранних стадиях репродукции вируса (8-10 часов).

В результате проведенных исследований прямым ИЦХ ИФА установлено, что конъюгаты МКА, специфичные к гликопротеину Gn вируса ЛДР, нуклеопротеину и гемагглютиниру Н5 и Н7 вируса гриппа птиц и нуклеопротеину вируса болезни Ньюкасла способны выявлять их антигенные детерминанты через 10-24 часа после инфицирования, задолго до начала проявления очевидных признаков ЦПД и накопления вируса в культуральной жидкости инфицированных чувствительных к вирусу линий.

Полученные результаты подтверждены в РНГА, РГА, РТГА и непрямым методе ТФ ИФА с использованием в качестве антигенов культуральные жидкости и лизаты инфицированных клеток линий ПСГК и ПС, полученные через 2-3 суток после заражения.

Чувствительность прямого ИЦХ ИФА на основе соответствующих МКА изучали при заражении культуры клеток ПСГК и ПС десятикратными разведениями вирусов ГП и ЛДР. В результате, даже при дозе заражения разведением вируса 10^{-4} - 10^{-5} (при исходном титре $6,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$) через 8-10 часов культивирования удастся выявить антигенные детерминанты NP и NA соответствующего подтипа ВГП, а NC и Gn/Gc вируса ЛДР через 10-18 часов культивирования - в виде гранул или диффузного специфического окрашивания цитоплазмы, ядра или околоядерной зоны клеток указанных линий, инфицированных штаммами соответствующего вируса, при отсутствии такового в культуре, зараженной штаммами гетерологичных подтипов и в интактной культуре.

Полученные результаты показали возможность использования перевиваемых культур клеток МДСК, ПСГК, ПС и CV-1 для ранней лабораторной диагностики гриппа птиц, болезни Ньюкасла и ЛДР, а также для изоляции вирусов и приготовления специфических антигенов. При этом

исключается нестандартность РЭК, нередко отрицательно сказывающаяся при производстве вакцин и диагностических препаратов, а также сложность получения СПФ РЭК при возникновении вспышек ГП и НБ. Применение высокочувствительного ИЦХ ИФА с использованием перевиваемых культур клеток и специфических моноклональных антител не требует использования дополнительных методов очистки и концентрирования вируса, выделения вирусной РНК (для проведения РДП, ОТ ПЦР), для регистрации результатов необходим световой микроскоп. Метод является экономичным, высокочувствительным, специфичным и может быть рекомендован для ранней диагностики вирусов особо опасных инфекций и мониторинга их распространения. Время, необходимое для выявления антигенов указанных вирусов с использованием высокочувствительного ИЦХ ИФА на перевиваемых культурах клеток ограничивалось 24 часами. Применение непрямого и прямого ИЦХ метода ИФА на основе поли- и моноклональных антител к различным подтипам вируса гриппа А позволило одновременно идентифицировать и типировать изоляты. Прямая корреляция между деструктивными изменениями в культуре клеток ПСГК, выявлением антигенов вирусов ИГХ методом ИФА и уровнем вирулентности штамма (изолята) позволила идентифицировать и дифференцировать высоковирулентные (велогенные) и низкопатогенные (лентогенные) штаммы (изоляты) вирусов ГП и НБ.

Разработанный метод визуального выявления репродукции вирусов в культуре клеток при выделении их на данной модели имеет временное преимущество перед использованием животных. Выделение вируса ЛДР на мышат 1-3 суточного возраста, взрослых мышах, хомяках с последующей идентификацией возбудителя занимает минимум трое суток. ИЦХ ИФА – 24 часа, что особенно важно при возникновении экзотических и трансграничных болезней, при этом происходит одновременно детекция, идентификация и выделение вируса.

4.2.2.2. Разработка тест-системы на основе моноклональных антител для идентификации и дифференциации гриппа птиц и болезни Ньюкасла

В 2002 году успешно проведены межведомственные комиссионные испытания опытно-промышленных серий «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла «сэндвич»-вариантом ТФ ИФА» на соответствие требованиям ТЗ и ТУ-10-09-110-90. Для решения вопроса о внедрении в ветеринарную практику предлагаемого «Набора препаратов...», в 2002-2005 гг. проведены широкие научно-производственные испытания «Набора препаратов...» в ветеринарных диагностических лабораториях РФ, которые выявили недостатки, связанные с нестабильностью нативных компонентов «Набора препаратов...»; слабой чувствительностью и необходимостью проведения пассажа на КЭ при выявлении антигенов вируса болезни Ньюкасла. Поэтому нами проведены исследования по улучшению качества и повышению чувствительности данного «Набора препаратов...» [Приложения 13-16]

4.2.2.2.1. Разработка двухсайтового твердофазного ИФА на основе моноклональных антител для идентификации вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Чувствительность и специфичность двухсайтового ТФ ИФА (ДАС-ИФА) напрямую связана с наличием МКА, не конкурирующих между собой, направленных к разным далеко отстоящим друг от друга эпитопам антигена.

При разработке ДАС ТФ ИФА проведены исследования по подбору пары МКА к нуклеопротеину вируса НБ; отработке оптимальных условий постановки реакции: дозы сенсibilизации полистироловых планшетов МКА; рабочего разведения пероксидазных конъюгатов специфических МКА.

Данные изучения активности и специфичности МКА реклонированных хранящихся в коллекции музея клоновгибридом, полученных к антигенным детерминантам нуклеопротеина вируса НБ [30, 87], представлены в таблице 11. Как видно из данных, представленных в таблице 11, активность МКА клонов 3G4 и 4B9 оказались более высокой и специфичной. Они выявляли антиген вируса болезни Ньюкасла (ПМВ-1), не взаимодействуя с антигенами вируса гриппа птиц и ПМВ-2.

Изучение эпитопной специфичности МКА клонов 3G4 и 4B9 в конкурентном ТФ ИФА показало, что они взаимодействуют с различными

антигенными детерминантами нуклеопротеина, расположенными далеко друг от друга, так как процент конкуренции составил не более 36%.

Таблица 11

Обнаружение антигена вируса болезни Ньюкасла в сэндвич-варианте ТФ ИФА при использовании МКА

Вирусы/МКА*	Титр антигена(log ₂ n=3)				
	А/ВГП/Н7N2	ПМВ-1 (Т-53)	ПМВ-2 (б. Юкейпа)	В-1	Ла-Сота
4Н10*	3-4	12-13	8-9	11-12	9-10
3Е2	2-4	11-12	9-10	10-11	9-10
4В9	1-2	12-13	3-4	11-12	11-12
3G4	1-2	11-12	2-4	10-11	10-11
5С10	11-12	1-2	1-2	1-2	1-2

Примечание: *приведены шифры реклонированных клонов гибридом, продуцирующих МКА к нуклеопротеину вируса НБ

Отработка параметров сенсibilизации твердой фазы моноклональными антителами

Важнейшим фактором, определяющим чувствительность сэндвич-варианта ТФ ИФА, является концентрация активных антигенсвязывающих сайтов антител адсорбированных на поверхности твердой фазы. С целью сохранения активности иммобилизуемых МКА использован ряд подходов повышения чувствительности и специфичности метода, отработаны параметры сенсibilизации твердой фазы моноклональными антителами. На примере МКА к нуклеопротеину гриппа А клон 1С6 показано влияние температуры, рН буферных растворов для сенсibilизации (КББ, 3ФР), времени обработки и действие некоторых химических веществ (перйодат натрия, глютаровый альдегид, Трис-глициновый буфер рН 2,8) на чувствительность метода. Результаты представлены в таблице 12. Из приведенных данных в таблице 12, очевидно, что обработка пластин 1% глютаровым альдегидом ведет к увеличению в 3-3,5 раза значений ОП₄₀₅ по сравнению с пластинами, сенсibilизированными МКА на буфере КББ рН 9,5 без предварительной обработки планшета. Обработка пластин NaIO₄ или Tris-

глициновым буфером pH 2,8 не привела к увеличению значений ОП₄₀₅лунок со специфическим антигеном.

Таблица 12

Влияние обработки пластин различными буферными растворами на выявление антигена вируса гриппа птиц штамм А/Самарканд/ Н7N2 в сэндвич-варианте ТФ ИФА

№ п/п	Обработанный антиген	Значения ОП ₄₀₅ при обработке планшетов (n=3)				
		1% глютаровый альдегид		Трис-глициновый буфер	NaIO ₄	Набор КББ
		ЗФР	КББ	pH 2,8	20мг/мл	
1	Не обработанный	0,6±0,5	0,7±0,6	0,2±0,1	0,6±0,5	0,7±0,7
2	обраб.1% Тритон-X100	0,9±0,2	0,8±	0,2±0,5	0,4±0,6	0,9±0,4
	обраб.0,5% Тритон-X100	1,6±0,7	1,7±0,8	0,9±0,2	0,6±0,5	1,4±0,6
7	0,2М ГТЦ	1,9±0,3	1,8±0,9	0,3±0,2	0,4±0,5	1,3±0,1
8	1М мочевины	1,5±0,4	1,6±0,5	0,2±0,4	0,3±0,4	1,3±0,2
9	2М мочевины	1,4±0,6	1,5±0,4	0,3±0,2	0,6±0,	1,2±0,6
10	4М мочевины	1,4±0,4	1,5±0,4	0,3±0,2	0,7±0,6	1,2±0,5
11	Т-53 н/о	0,2±0,15	0,3±0,1	0,07±0,05	0,08±0,03	0,05±0,01
12	Ла-Сота н/о	0,4±0,08	0,2±0,1	0,1±0,02	0,08±0,05	0,07±0,04
13	Ла-Сота обр. тритоном X-100	0,25±0,03	0,3±0,1	0,1±0,06	0,1±0,07	0,04±0,01
14	контроль коъюгата	0,15±0,05	0,16±0,07	0,12±0,04	0,1±0,05	0,15±0,09
15	Н ЭЭЖ	0,10±0,09	0,10,1±0,03	0,1±0,04	0,1±0,01	0,10,1±0,03
16	1% казеин	0,1±0,04	0,1±0,05	0,1±0,03	0,1±0,09	0,1±0,04

Из приведенных данных в таблице 12, очевидно, что обработка пластин 1% глютаровым альдегидом ведет к увеличению в 3-3,5 раза значений ОП₄₀₅ по сравнению с пластинами, сенсibilизированными МКА на буфере КББ pH 9,5 без предварительной обработки планшета. Обработка пластин NaIO₄ или Tris-глициновым буфером pH 2,8 не привела к увеличению значений ОП₄₀₅лунок со специфическим антигеном.

Проведенные исследования воздействия детергентов показали, что обработка специфических антигенов 0,2М гуанидинтиоцианатом (ГТЦ), 2 М мочевиной ведет к увеличению значений ОП₄₀₅лунок со специфическим антигеном в 1,5-3,0 раза. Обработка пластин 1% раствором глютарового альдегида, NaIO₄ и трис-глициновым буфером перед сенсibilизацией МКА

клона 3G4 не привела к увеличению значений ОП₄₀₅ по сравнению с пластинами, сенсibilизированными МКА на буфере КББ pH 9,5. Однако, отмечается увеличение фонового уровня ОП₄₀₅ до 0,4 при обработке пластин 1% раствором глутарового альдегида перед сенсibilизацией МКА, что не желательно при дифференциальной диагностике этих болезней.

Обработка антигена ВБН смесью тритона X-100 и казеина привела к увеличению значений ОП₄₀₅ в 2 и более раз, остальные детергенты не оказывали желаемого воздействия по освобождению антигенных детерминант вируса болезни Ньюкасла.

Результаты изучения влияния длительности экспозиции субстратного буферного раствора на увеличение проявления реакции (ОП₄₀₅) показали, что продление срока инкубации с субстратным буфером до 40-60 минут практически не приводит к увеличению оптической плотности лунок (ОП₄₀₅=0,01-0,1), в которых инкубировали отрицательный контроль, гетерологичный антиген и контроль конъюгатов, тогда как ОП₄₀₅ содержимого лунок, в которых инкубировали специфические антигены, возрастала в 2-3 раза и составляла от 0,4 до 0,9.

Нами проведено изучение влияния различных сочетаний МКА, используемых для сорбции на полистероле и в качестве конъюгата на чувствительность и специфичность ДАС ТФ ИФА.

Для этого необходимо было определить рабочую дозу сенсibilизации и оптимальный вариант сочетания моноклональных реагентов (МКА для сенсibilизации полистирола и МКА, конъюгированных с ПХ), оптимальное время инкубации на всех стадиях ТФ ИФА. Основными показателями, по которым проводили оценку методических вариаций, были специфичность и чувствительность метода.

Оптимальную дозу моноклональных антител для сорбции на полистироле определяли в серии опытов методом «шахматного титрования» ТФ ИФА препаратов специфических и нормального антигенов против рабочей

дозы конъюгатов МКА на планшетах, сенсibilизированных разными дозами МКА.

Планшеты, обработанные 1% раствором глутарового альдегида сенсibilизировали двукратными разведениями МКА клонов 5C10, 1C6 к ВГП и клонов 3G4, 4B9 к ВБН от 10 мкг/лунку до 0,075мкг/лунку на 0,05М КББ рН 9,6 при 37°C в течение 1-1,5 часов. Дальнейшие процедуры проводили по стандартной методике постановки ТФ ИФА.

Минимальной сенсibilизирующей дозой МКА к ВГП и ВБН считали то наибольшее их разведение, при котором рабочее разведение конъюгата выявляло антиген вируса, а реакция с нормальным антигеном была меньше или равной фоновой. Результаты исследований, представленные на рисунках 16 и 17.

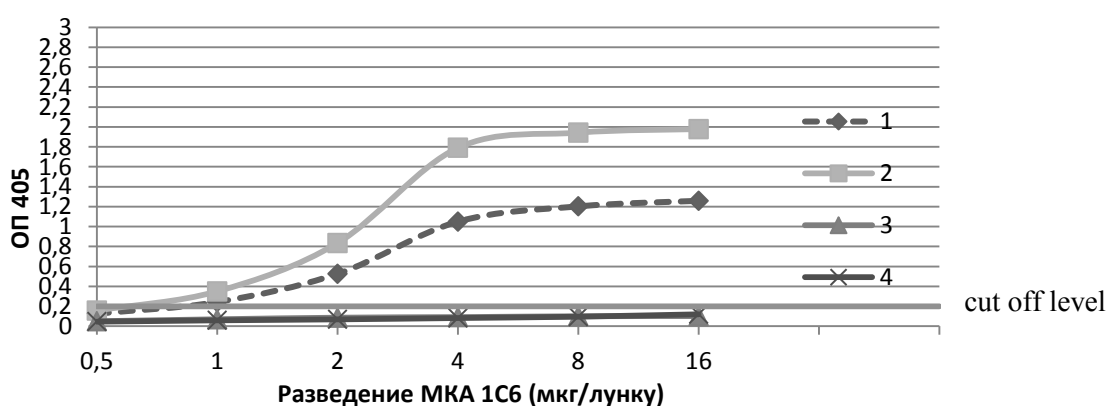


Рис. 16 - Зависимость показателей оптической плотности конъюгатов МКА 1C6 и МКА 5C10 от концентрации МКА клона 1C6, используемых для сенсibilизации планшет. Результаты взаимодействия (ОП₄₀₅) рабочей дозы конъюгатов МКА 1C6 (1) и МКА 5C10 (2) со специфическим антигеном; МКА 1C6 (3) и МКА 5C10 (4) с нормальным антигеном.

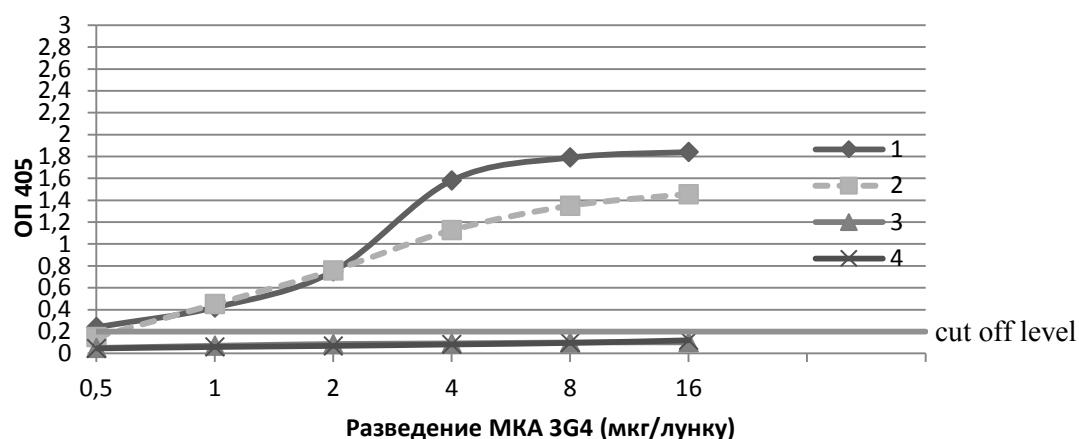


Рис.17 - Зависимость показателей оптической плотности конъюгатов МКА4В9 и МКА 3G4 от концентрации МКА 3G4, используемых для сенсibilизации планшет. Результаты взаимодействия (ОП₄₀₅) рабочей дозы конъюгатов МКА 4В9(1) и МКА 3G4 (2) со специфическим антигеном; МКА 4В9 (3) и МКА 3G4 (4) с нормальным антигеном.

Проведенные исследования показали, что минимальная концентрация сенсibilизирующих МКА, при которой интенсивность окрашивания субстратного раствора в лунке со специфическим антигеном соответствовала положительному результату для клонов 1С6 и 5С10 составила 1,5 мкг/лунку; для клонов 4В9 и 3G4 составила 1 мкг/лунку. Из рисунков 16 и 17 очевидно, что концентрация – 3-5 мкг/лунку находящаяся в верхней части кривой (начало плато) обеспечивает максимальное выявление (захват) специфического антигена при минимальном уровне фоновой реакции. Дальнейшее увеличение сенсibilизирующей дозы антител до 8-16 мкг/лунку не приводило к существенному росту показателя ОП₄₀₅ выявляемого специфического антигена.

Определение рабочей дозы и различных сочетаний конъюгатов МКА в двухсайтовом твердофазном ИФА

При определении рабочей дозы конъюгатов клонов МКА в ДАС «сэндвич»-варианте ТФ ИФА готовили их двукратные разведения, начиная с 1:125 на ФБР-Т-БСА и вносили в лунки планшет, с образовавшимся на твердой фазе комплексом сенсibilизированных в оптимальной дозе соответствующих МКА и разведениями специфического и гетерологичного

антигенов. Схема титрования для каждого конъюгата представлена ниже, на примере титрования конъюгатов МКА клонов 5С10 и 4В9. Титром пероксидазного конъюгата считали наибольшее его разведение, которое достоверно выявляет антиген в максимальном его разведении при отсутствии реакции с контрольным отрицательным или гетерогенным антигеном. Рабочим разведением конъюгата считали удвоенный титр его активного предельного разведения.

Таблица 13

Определение дозы конъюгата МКА 5С10 к NP ВГП и специфичности «сэндвич» - варианта ТФ ИФА

	Разведение конъюгатов МКА	Разведение антигенов											
		конъюгат МКА клона 5С10											
		Антиген вируса ВГП						Антиген вируса ВБН					
		10	20	40	80	160	320	10	20	40	80	160	320
A	125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	250	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C	500	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D	1000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E	2000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
F	4000	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
G	8000	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	16000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: доза сенсибилизации планшета 4 мкг/лунку МКА клона 1С6; «+» - положительный результат; «-» - отрицательный результат

Таблица №14

Определение дозы конъюгата МКА 4В9 и специфичности «сэндвич» - варианта ТФ ИФА

	Разведение конъюгата МКА	Разведение антигенов											
		конъюгат МКА клона 4В9											
		Антиген вируса ВБН						Антиген вируса ВГП					
		10	20	40	80	160	320	10	20	40	80	160	320
A	125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B	250	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C	500	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D	1000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E	2000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
F	4000	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
G	8000	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H	16000	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: доза сенсибилизации планшета 4 мкг/лунку МКА клона 3G4; «+» - положительный результат; «-» - отрицательный результат

В результате проведенных исследований определено, что титр пероксидазных конъюгатов МКА клонов при оптимальной дозе

сенсibilизации твердой фазы 3-4 мкг/лунку составил: 5C10 и 4B9 – 1:4000, которые способны выявлять антигенные детерминанты нуклеопротеина соответствующего вируса.

Время инкубации реагентов на всех стадиях реакции составляло 1 час при комнатной температуре. Дальнейшее продление времени инкубации реагентов не приводило к значительному увеличению значений ОП₄₀₅. Результаты изучения влияния различных сочетаний МКА на чувствительность ДАС ТФ ИФА при выявлении антигенов вируса гриппа птиц и болезни Ньюкасла представлены в таблице 15.

Таблица № 15 - Выявление антигенов вируса гриппа птиц и болезни Ньюкасла в двухсайтовом «сэндвич»-варианте ТФ ИФА.

Клоны гибридом сорбированные на полистироле	Титр антигена (log ₂) вируса гриппа птиц и болезни Ньюкасла при выявлении конъюгатами МКА (n=3)			
	ВГП		ВБН	
	1C6	5C10	3G4	4B9
1C6	10-11	11-12	0	0
5C10	10-11	9-10	0	0
3G4	0	0	8-9	9-10
4B9	0	0	11-12	10-11

Данные, представленные в таблице 15, позволяют сделать вывод, что максимальную чувствительность ДАС ТФ ИФА для выявления антигена вируса гриппа птиц обеспечивало сочетание МКА клонов 1C6/5C10 с сенсibilизацией планшетов МКА клона 1C6 и выявление связавшегося антигена пероксидазным конъюгатом на основе МКА клона 5C10. Максимальную чувствительность ДАС ТФ ИФА для выявления антигена вируса болезни Ньюкасла обеспечивало сочетание МКА клонов 4B9/3G4.

Для изучения чувствительности ДАС ТФ ИФА на основе МКА нами использована экстраэмбриональная жидкость СПФ РЭК, инфицированных вирусом б. Ньюкасла штамм «Томилинский-53» и вирусом гриппа птиц подтипов Н5; Н7 с исходным титром инфекционной активности 8,5 lg ЭЛД/ЭИД_{50/см}³. В таблице 16 показаны результаты выявления методом ДАС ТФ ИФА антигенов нуклеопротеина вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла.

Положительной пробу считали ОП₄₀₅, которой в 2,1 раза превышала значение ОП₄₀₅ лунки, в которой инкубировали отрицательный контрольный антиген.

Таблица 16

Чувствительность ДАС ТФ ИФА выявления антигенов нуклеопротеина вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Разведение пробы	ТФ ИФА ОП ₄₀₅ (n=3)	
	ГП	НБ
10⁻²	0,554±0,05*	0,678±0,03
10⁻³	0,421±0,04	0,541±0,06
10⁻⁴	0,401±0,02	0,403±0,04
10⁻⁵	0,321±0,07	0,379±0,09
10⁻⁶	0,309±0,02	0,327±0,07
10⁻⁷	0,203±0,08	0,167±0,03
10⁻⁸	0,158±0,05	0,150±0,01
Контроль конъюгата	0,146±0,03	0,152±0,04

Представленные в таблице 16 данные показывают, что разработанный ДАС ТФ ИФА и на его основе «Набора препаратов...» позволяет выявлять специфический антиген в разведении пробы до 10⁻⁶. То есть методом ДАС ТФ ИФА возможно выявление инфицированного материала с титром инфекционной активности 2,0-2,5 lg ЭЛД/ЭИД_{50/см3} и выше.

Таким образом, разработанный метод ДАС ТФ ИФА с использованием МКА к нуклеопротеину вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла может быть рекомендован для диагностики указанных болезней как высокочувствительный и специфический метод. Явное преимущество, которого заключается в простоте использования, возможности полной автоматизации, использовании высококачественных стандартизованных реагентов.

Отработка оптимального режима лиофильной сушки компонентов «Набора препаратов...» (конъюгатов, специфических моноклональных антител и вирусных антигенов)

Так как проведенные научно-производственные испытания «Набора препаратов...» показали нестабильность входящих в его состав нативных компонентов при хранении и транспортировке. Нами совместно Новиковой М.Б. проведены исследования по отработке параметров оптимального режима

сублимации, подбору стабилизирующих буферных растворов для конъюгатов МКА и антигенов, позволяющих сохранить исходную активность препаратов в течение 12 месяцев хранения при температуре 4-8°C.

Буферные растворы для лиофильной сушки готовили на основе 0,5 М ФБР pH 7,2-7,4 с добавлением сахарозы до конечной концентрации 2%; БСА до конечной концентрации 10-12 мг/см³ для конъюгатов и МКА; для лиофилизации специфических антигенов в состав стабилизирующего буфера включали 1% раствор мочевины и 1% раствор KCl. Режимы лиофильной сушки эмпирически отработывали для каждого препарата отдельно. Характеристику лиофильно высушенного препарата определяли по товарному виду – наличию таблетки; растворимости; остаточной влажности; ферментной и специфической активности в ТФ ИФА; стабильности при хранении. Лيوфильное высушивание препаратов осуществляли на сублимационной установке «Эдвандс» (Англия). Препараты расфасовывали с высотой столба не более 0,5 см, замораживали в вертикальном положении при температуре минус 60-70°C не менее 18-24 часов. Перед замораживанием в ампулы с препаратом, предназначенным для лиофилизации, помещали термодатчики для подсоединения их к регистрирующим приборам низкотемпературных и сублимационных установок с целью контроля температурных режимов при её замораживании и лиофильной сушке.

Контроль процесса сушки вели по температурным данным и остаточному давлению в сушильной камере. Остаточное давление в сублиматоре не превышало 100 мкм. После окончания сушки в камеру пускали стерильный воздух, пока давление в ней не уравнивается с наружным. Затем открывали крышку камеры и ампулы с препаратом быстро перекладывали в металлические эксикаторы (вакуум-бачки), в которых высушенный материал находился под вакуумом до момента запайки ампул. Ампулы герметически запаивали в день разгрузки аппарата на вакуумных коллекторах при вакууме не более 100 мкм.

Результаты проведенных исследований определили: оптимальными условиями лиофилизации являются - объем 0,5 см³ в ампуле, количество белка не менее 10-12 мг/см³, время предварительного замораживания 18- 24 часа. Также установили, что отработанный режим лиофильной сушки - температура конденсатора минус 65-68°C; вакуум – 17-20 ПА. Процесс сушки заканчивается при поддержании постоянной температуры в препарате (25° С) в течение 2,5-3 часов при полном остаточном давлении; длительность процесса лиофильной сушки 15-18 часов - позволяет получать образцы сухих препаратов, имеющих форму таблетки, быструю растворимость в течение 1-2 мин и остаточную влажность – 2,5-3%. Специфическая и ферментная активность лиофилизированных препаратов не снижалась в процессе лиофильной сушки и сохранялась в последующем в течение 2 лет (срок наблюдения).

Таким образом, проведенные исследования позволили разработать тест-систему ДАС ТФ ИФА «Набор препаратов на основе моноклональных антител для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла» для одновременной идентификации и дифференциации ВГП и ВБН.

4.2.2.2.2. Изучение активности и специфичности «Набора препаратов на основе моноклональных антител для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла»

Целью дальнейшей исследований явилось изучение чувствительности, специфичности ДАС ТФ ИФА, являющего основой «Набора препаратов...» и возможности одновременной дифференциации гриппа птиц и болезни Ньюкасла при выявлении специфических антигенов вирусов этих болезней в полевых образцах клинического и патологического материала. Для исследования использовали: - 20% суспензию внутренних паренхиматозных органов и тампонные пробы (носоглоточные и клоакальные смывы) от диких уток, серых гусей, отловленных в ГК «Завидово» в 2008-2009 гг.; в качестве положительного контроля органы и ткани кур, экспериментально зараженных вирусом гриппа птиц подтипа H5N1; H5N3 и вирусом болезни Ньюкасла

штамм «Т-53». Результаты проведенных исследований представлены в таблице 17.

Таблица 17

Чувствительность и специфичность ДАС ТФ ИФА при выявлении антигенов вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасл полевых образцах клинического и патологического материала

Исследуемый антиген		Активность антигенов (n=3)				
		ДАС ТФ ИФА (ОП ₄₀₅)		РГА(log ₂)	РТГА	
		ГП	НБ		ГП	НБ
Нормальный антиген		0,12±0,02	0,15±0,03	0	0	0
АГ вируса ГП*		1,8±0,01	0,15±0,07	10,2±0,04	+	-
АГ вируса НБ*		0,16±0,04	1,75±0,4	10,87±0,02	-	+
Суспензия внутренних паренхиматозных органов**	дикие утки (кряква, утка серая)	1,5±0,06	1,7±0,05	7,56±0,06	+	+
	серый гусь	0,97±0,01	1,4±0,02	6,4±0,035	+	+
	голубь	0,15±0,03	2,6±0,04	8,98±0,016	-	+
	лебедь	1,1±0,02	0,13±0,03	6,74±0,012	+	-
	цыпленок А/Тыва/2005	2,4±0,03	0,12±0,04	5,9±0,04	+	-
	цыпленок А/Курган/2005	2,7±0,04	0,16±0,01	5,64±0,07	+	-
Тампонные образцы**	носоглоточные смывы	0,45±0,01	0,2±0,04	2,97±0,023	-	-
	клоакальные смывы	1,0±0,07	0,18±0,04	3,57±0,06	+	-
ЭЭЖ РЭК***	А/Н7N1	2,3±0,02	0,15±0,03	10,24±0,09	+	-
	А/Н5N1	2,0±0,06	0,11±0,05	10,4±0,03	+	-
	ПМВ1 Ла Сота	0,16±0,05	2,5±0,04	9,12±0,08	-	+
	ПМВ1 Т-53	0,14±0,01	2,6±0,02	11,48±0,02	-	+

Примечание: * - специфические антигены 12 мес. хранения; ** - объединенные пробы; *** - амнион-аллантоисная жидкость СПФ РЭК; «+» - положительный и «-» - отрицательный результат реакции РТГА.

Из результатов таблицы 17 очевидно, что величина ОП₄₀₅ прямо пропорциональна концентрации антигена в пробе. Специфичность полученных данных ТФ ИФА подтверждена в РЗГА со специфическими референс-сыворотками. Полученные результаты, представленные в таблице, свидетельствуют, что метод ДАС ТФ ИФА является высокоспецифическим методом, позволяя выявлять антигенные детерминанты нуклеопротеина

вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла в полевых пробах, в том числе и клинических тампонных пробах без предварительного проведения пассажей на СПФ РЭК.

Используя «Набор препаратов...» и прямой «сэндвич»-вариант ТФ ИФА на основе МКА к антигенным детерминантам гемагглютиниона пятого и седьмого подтипов вируса гриппа птиц [21; Приложение 4 и 5] при проведении мониторинга распространения указанных болезней в центральном и Северо-Западном регионе РФ нами исследованы пробы паренхиматозных органов (селезенка, печень, почки, сердце), кишечника и тампонных проб (носоглоточные и клоакальные смывы) от 43 серых гусей и диких уток, отстрелянных на территории Госкомплекса «Завидово» в 2009 году, получены следующие результаты: в 14% (6 проб) из числа исследованных проб выявлен антигенные детерминанты нуклеопротеина вируса ВБН, 88% (38 проб) положительно реагировали с МКА к NP вируса гриппа птиц, из них 94% (36 проб) положительно реагировали с МКА к ГА 5-го серотипа и 71% (27 проб) реагировали с МКА к 7-му серотипу. Также установлено ассоциированное проявление вирусной инфекции. В 37% (16 проб), выявлены одновременно наличие антигенов вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла, отмеченное в большинстве случаев у серой утки более 60%, серого гуся свыше 50%, кряквы и чернети до 40%. Результаты были подтверждены в РГА и РТГА с моноспецифическими референс сыворотками к вирусу болезни Ньюкасла и подтипам H5 и H7 вируса гриппа птиц.

Результаты проведенных исследований показали, что разработанный ДАС ТФ ИФА и на его основе «Набор препаратов...» позволяет выявлять специфический антиген (нуклеопротеин) и дифференцировать вирус гриппа птиц и болезни Ньюкасла в пробах экстраэмбриональных жидкостей зараженных эмбрионов кур; лизатов зараженных клеточных культур; суспензии внутренних паренхиматозных органов; тампонных пробах (носоглоточных и клоакальных смывов) от инфицированной и больной птицы, имеющих титр инфекционной активности вируса 2,0-2,5 lg ЭИД_{50/см3} и выше.

Причем антигены вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла одновременно выявляли в пробах, содержащих смесь этих вирусов, что практически не возможно в РГА. К тому же, используя конъюгаты МКА клонов 5С10 или 1С6, возможна дифференция штаммов вируса гриппа птиц и млекопитающих.

В ходе проведения исследования проб клинического и патологического материалов от птиц экспериментально зараженных вирусом гриппа птиц H5 и велогенным штаммом болезни Ньюкасла установлено, что отбор проб для исследования должен проводиться, соответственно, в период максимального проявления клинических признаков болезни, но не позднее 5-7 суток с момента проявления и не позднее 24 часов с момента гибели птицы.

В соответствии с Федеральным законом от 27.12.2002 г., №184-ФЗ «О техническом регулировании» взамен ТУ-10-09-110-90 на основании полученных результатов исследований разработан Стандарт организации - СТО (ТУ) 00495549-0011-2006 по изготовлению и контролю «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла» и Инструкция по его применению, утвержденные 31.10.2006 г. заместителем руководителя Росветнадзора РФ. С 2006 г «Набор препаратов...» был внедрен в ветеринарную практику РФ.

За период 2005-2012 гг. при использовании «Набора препаратов...» были выявлены и впоследствии выделены: вирус гриппа птиц в 2007-2009 гг. - (Краснодарский край, Адыгея, Московская область – от диких и домашних птиц); болезни Ньюкасла в пробах инфицированного материала от голубей из Калужской области (изолят «Юхнов» IV генотипа второго генетического класса). В 2012-2013 гг. с использованием компонентов «Набора препаратов...» - в пробах инфицированного материала от голубей из Башкирии, Абхазии и г. Москва (изолят «уголок Дурова» VI генотипа второго генетического класса).

Преимуществом усовершенствованного «Набора препаратов...» - является стабильность компонентов в процессе хранения; минимальный объем исследуемого материала – 50 мм³, получение результатов в течение 2-3 часов. Используемые МКА обладают видовой специфичностью, что особенно важно

для вируса гриппа А. Для постановки реакции на месте необходима только дистиллированная вода.

4.2.2.3 Выявление пероксидазы хрена в качестве активной метки методом иммунохемилюминесцентного анализа

В последнее время в качестве детектирующих систем в ИФА нашли применение ферментативные реакции, энергия которых реализуется в виде светового излучения — реакции био- и хемилюминесценции. Принцип метода заключается во взаимодействии люминола и пероксида в присутствии пероксидазы хрена, конъюгированной с МКА второго клона, что приводит к образованию окисленного люминола, который обладает люминесцентным свечением при длине волны 425 нм. Интенсивность хемилюминесценции пропорциональна количеству исследуемого антигена в пробе. Активность пероксидазы оценивали по интенсивности образующегося сигнала хемилюминесценции.

С целью повышения чувствительности ДАС ТФ ИФА на основе МКА к нуклеопротеинам вирусов гриппа птиц, болезни Ньюкасла изучена возможность применения пероксидазы хрена в качестве катализатора реакции окисления циклических гидразидов перекисью водорода (реакция хемолюминесценции). Проведено сравнительное изучение чувствительности и специфичности ИФА с хемилюминесцентной (ИХА) и фотометрической (ТФ ИФА) детекцией результатов реакции для выявления антигенов вирусов и антител к ним. Работу проводили совместно сотрудниками ФГБУ ЦНМВЛ (Косино, Московская область). Для отработки оптимальных параметров проведения анализа нами в качестве модельной тест-системы взят ДАС ТФ ИФА на основе МКА к нуклеопротеинам вирусов гриппа птиц, болезни Ньюкасла. В работе использовали компоненты «Набора препаратов...» серия №2 от 2012 года, а также вирусосодержащий материал с активностью не ниже 1:512-1:1024 в РГА: экстраэмбриональная жидкость (ЭЭЖ) СПФ РЭК, инфицированных вирусом гриппа птиц H1; H5; H7; инфицированных вирусом болезни Ньюкасла; осветленная низкоскоростным центрифугированием 20% суспензия паренхиматозных органов птиц, инфицированной данными

вирусами. В качестве отрицательного контроля служили ЭЭЖи 20% суспензия интактных СПФ РЭК и птиц, соответственно. Твердой фазой служили планшеты для ИФА из непрозрачного пластика, одновременно являясь платой для измерения интенсивности люминисценции.

Оптимизацию параметров проведения анализа проводили отдельно для каждого способа детекции. Были оптимизированы: концентрации реагентов, а также время проведения стадий анализа, обеспечивающих его оптимальную чувствительность. Результаты проведенных исследований показали возможность применения в ИХА пероксидазного конъюгата МКА к нуклеопротеину вируса гриппа птиц и болезни Ньюкасла. Однако использование конъюгата в рабочей дозе для ТФ ИФА с фотометрической детекцией не целесообразно, так как это приводит к высокой фоновой реакции. В ИХА расчет соотношения значений сигнал/фон составил: для вируса гриппа от 3,5 до 6,4; для вируса болезни Ньюкасла – 4,3-6,5. Разведение рабочей дозы пероксидазного конъюгата МКА в 10 раз привело к снижению фоновой реакции в 6,0-8,7 раза и повышению уровня специфического взаимодействия антиген/антитело - соотношение сигнал/фон составило 10,3-11,3 и 10,5-11,4 для вируса гриппа и болезни Ньюкасла, соответственно. Время контакта антигена с иммобилизированными МКА, вторичных меченых пероксидазой МКА составило 60 мин. при температуре 18-22°C. Время контакта с субстратным буфером для ТФ ИФА – 40-60 мин.; считывание результатов реакции при ИХА необходимо проводить сразу после внесения субстратного буфера.

Результаты исследований показали, что ИХА является специфическим чувствительным методом для выявления антигенных детерминант нуклеопротеина вирусов гриппа и болезни Ньюкасла.

Для сравнительного изучения чувствительности методов нами использована экстраэмбриональная жидкость эмбрионов кур (СПФ РЭК), инфицированных вирусом б. Ньюкасла штамм «Томилинский-53» и вирусом гриппа птиц подтипов Н1; Н5; Н7 с исходным титром инфекционной

активности $8,5 \lg \text{ЭЛД/ЭИД}_{50/\text{см}^3}$. В таблице 19 показаны результаты выявления антигенов нуклеопротеина вирусов методом ДАС ТФ ИФА при фотометрическом и хемилюминисцентном методах детекции.

Таблица 19

Сравнительная чувствительность ДАС ТФ ИФА при различных методах детекции

Разведение пробы	Активность антигенов (n=3)			
	ТФ ИФА ОП ₄₀₅ колориметрический метод детекции		ИХА ОП _{RLUX1000} хемилюминисцентном методе детекции	
	ГП	НБ	ГП	НБ
10^{-2}	0,554±0,05*	0,678±0,03	797±0,2*	16640±0,5
10^{-3}	0,421±0,04	0,541±0,06	574±0,2	15760±0,3
10^{-4}	0,401±0,02	0,403±0,04	538±0,1	14439±0,1
10^{-5}	0,321±0,07	0,379±0,09	439±0,5	13398±0,2
10^{-6}	0,327±0,02	0,307±0,07	351±0,1	12685±0,3
10^{-7}	0,203±0,08	0,167±0,03	332±0,1	7326±0,3
10^{-8}	0,158±0,05	0,150±0,01	101±0,2	5589±0,5
Контроль конъюгата	0,146±0,03	0,142±0,04	95±0,4	3236±0,1

Примечание: * - в таблице даны средние величины оптических плотностей (ОП₄₀₅ и ОП_{RLUX1000}) проб материала

Представленные в таблице данные показывают, что иммуноферментный анализ с хемилюминесцентной детекцией позволяет выявлять специфический антиген в разведении пробы до 10^{-7} , что на порядок выше, чем при фотометрическом методе детекции. То есть методом ИХА можно выявлять вирусный антиген в инфицированном материале, имеющем титр инфекционной активности $1-1,5 \lg \text{ЭЛД/ЭИД}_{50/\text{см}^3}$ и выше.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования пероксидазы хрена в качестве метки в иммунохемилюминисцентном анализе. Установлено, что снижение рабочей дозы пероксидазного конъюгата специфических МКА в 10 раз (при сохранении всех остальных параметров тест-системы) привело снижению фонового уровня с отрицательным, гетерологичными антигенами, сохранению специфичности и повышению чувствительности реакции.

Метод ИХА может быть рекомендован для диагностики инфекционных болезней как высокочувствительный и специфический метод. Его отличает: высокая чувствительность – белки определяются в пикограммовых

количествах; экономия антител: требуется минимальное количество моноклональных антител; низкий уровень фоновой реакции с неспецифическим антигеном, при детектируемом уровне реакции со специфическим антигеном.

4.2.3 Разработка средств серологического мониторинга лихорадки долины Рифт, гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Большинство особо опасных инфекционных болезней свойственны, как домашним, так и диким животным. Определение уровня инфицирования дикой и синантропной птицы различными вирусами важно вследствие их экологической роли естественных хозяев и резервуара возбудителей многих инфекционных болезней животных и человека. Выявление наличия специфических антител в сыворотке крови вакцинированных и переболевших животных является не менее важным аргументом, соответственно, развития иммунного ответа и наличия инфекции, чем обнаружение специфического антигена.

4.2.3.1 Разработка непрямого ТФ ИФА для выявления специфических антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Целью исследований данного раздела явилась разработка непрямого ТФ ИФА для выявления в сыворотках крови животных специфических антител к вирусам ГП, НБ.

Для отработки оптимальных параметров постановки непрямого ТФ ИФА (нТФ ИФА) использовали: концентрированные антигены вирусов ГП и НБ, полученные на СПФ РЭК; положительные референс-сыворотки полученные из музея штаммов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии с активностью не ниже 1:256-512; сыворотки крови кур, экспериментально инфицированных указанными вирусами; МКА к нуклеопротеину ГП, НБ; гемагглютнину пятого и седьмого подтипов вируса ГП. Для выявления специфического комплекса антиген-антитело использовали пероксидазный конъюгат IgG козы против Ig кур. Методом шахматного титрования определены оптимальные концентрации адсорбции антигена на твердой фазе,

рабочего разведения контрольных положительной и отрицательной сывороток и конъюгатов антивидовых антител. В результате исследований определены: оптимальная доза частично очищенного концентрированного антигена (ВГП, ВБН) для сенсibilизации лунок планшета, которая составила 80 ГАЕ (разведение на 0,05 М КББ pH 9,5 1:800 для антигена вируса НБ и 1:1600 для антигена вируса ГП); режим сорбции: 18-20 час. при температуре при 4-8°C или 1,5-2 часа 37°C. Для выявления специфических АТ к гемагглютинирующему НА5 и НА7 лунки полистироловых планшетов сенсibilизировали антигеном соответствующего подтипа; для выявления антител в вирусу гриппа А в сыворотках крови свиней – антигеном вируса гриппа свиней подтипа Н1; Постановку нТФ ИФА проводили по общепринятой методике, на полистироловых планшетах (SPL, Maxibinding), основываясь на стандартных процедурах твердофазного иммуноферментного анализа (Егоров А.М., 1991.). На каждом планшете помещали контроли сывороток: отрицательной (4 повторности), положительной (2 повторности), антивидового конъюгата и субстратного раствора. Параллельно проводили исследования сывороток в РЗГА с 4 ГАЕ вируса ГП, НБ. Серийные разведения (2-, 4-х-кратные) контрольных и испытуемых сывороток на 1% растворе БСА-ФБР-Т готовили на отдельном полистироловом планшете, блокированном 1% раствором БСА. Разведения контрольных отрицательной и положительной сывороток готовили тем же шагом, что и исследуемых, начиная с разведения предыдущего рабочего разведению, определенному заранее.

С целью оптимизации условий постановки непрямого ТФ ИФА для выявления специфических антител в одном разведении предварительно тестировали 20 проб сывороток кур, экспериментально инфицированных и иммунизированных, имеющих различные уровни антител к вирусу ГП И НБ, предварительно определенные в РЗГА. Для каждой сыворотки в разведении 1:50, 1:100 и 1:200 определяли титр, допустимые значения ОП₄₀₅ контрольных сывороток и процент позитивности S/P. С помощью компьютерной программы «Statgraphic (Version 2.1)» рассчитывали стандартную ошибку,

коэффициент корреляции. Каждое из исследованных разведений имели сильную корреляционную взаимосвязь ($r=0,87-0,95$ для ГП; $r=0,89-0,97$ для НБ) при практически одинаковых значениях стандартной ошибки 0,05. Наибольшее значение r соответствовало разведению сыворотки 1:50, поэтому данное разведение использовали в качестве рабочего.

Для определения позитивно-негативного порога исследовали 20 заведомо отрицательных сывороток крови кур в разведении 1:50. Среднее значение ОП₄₀₅ составило 0,153. Прибавляя два и три значения стандартного отклонения, получили зону сомнительных результатов, которая попадает в промежуточный интервал 0,183-0,198. Сыворотки считали отрицательными, если соотношение S/P составляло менее 0,2; положительными – более 0,3 и сомнительными в интервале $0,2 < S/P < 0,3$. Также установлены допустимые значения ОП₄₀₅ для положительного контроля выше 0,49 о.е., для отрицательного контроля – до 0,183 о.е. Также был определен уровень ОП₄₀₅ высокоактивных сывороток, который находился в пределах $1,98-2,15 \pm 0,07$ (титр в РЗГА 1:1024-1:2048) и для сывороток с низкой активностью – $0,3-0,62 \pm 0,03$ (титр в РЗГА 1:64-1:128).

За период 2007- 2009 г.г. нами исследовано более 560 проб сывороток от 29 видов дикой водоплавающей, береговой и синантропной птицы, отловленной на территории лесостепного района Алтайского края и расположенных в центральных областях Европейской части Российской Федерации Госкомплексов «Завидово» и «Таруса». За период 2006-2007 гг. исследовано 49 проб крови от диких свиней, обитающих на территории Госкомплексов «Завидово» и «Таруса». Исследуемые пробы сывороток тестировали в разведении 1:50. Сыворотки, имеющие в разведении 1:50 ОП₄₀₅ более 1,9 о.е. исследовали в нТФ ИФА в раститровке 4-кратным шагом от 1:200 до 1:12800. Результаты серологического мониторинга распространения ВГП, ВБН среди диких животных представлены в таблице 20.

Таблица 20

Результаты исследования проб сывороток птиц (перелетных, оседлых, синантропных) и диких кабанов на наличие специфических антител к вирусу гриппа А и болезни Ньюкасла

Общ ее кол- во	Вид птицы	Результаты исследования (n=3) (количество положительных проб/%)	
		ВБН	ВГП
40	Чирок <i>Anas crecca, querquedula</i>	23/57	25/62,5* (1-Н5,2-Н7)**
57	Кряква <i>Anas platyrhynchos</i>	35/61	38/66;(5-Н5,2-Н7)
64	Чернеть <i>Aythya fuligula, ferina, marila</i>	37/58	44/69 (4-Н5,2-Н7)
3	Соксан	1/33	1 /33
149	Утка серая <i>Anas strepera</i>	86/67	97/65 (19-Н5,7-Н7)
25	Лысуха <i>Fulica atra</i>	19/76	14/56 (1-Н5,1-Н7)
4	Крохаль <i>Mergus serrator, merganser</i>	4/100	3/75
5	Грач <i>Corvus frugilegus</i>	4/80	5/100
73	Гусь серый <i>Anser albifrons</i>	19/26	54/74(38-Н5, 33-Н7)
76	Голубь сизый <i>Columba livia</i> Gmelin	46/61	43 / 57 (1-Н5)
33	Воробей домовый <i>Passer domesticus</i>	14/42	16 / 49 (1-Н5)
22	Синица Большая <i>Parus major</i>	5/23	15/68 (1- Н5)
4	Шилохвость <i>Anas acuta</i>	2/50	2/50
7	Дрозд-рябинник <i>Turdus pilaris</i>	4/57	4/57
3	Сорока <i>Pica pica</i>	2/67	1/33 Н5,Н7
1	Перепел <i>Coturnix coturnix</i>	1/100	1/100
8	Атай Пеганка <i>Tadorna tadorna</i>	6/85	6/85
15	Чайка серебристая <i>Larus argentatus</i>	10/60	4/27 - Н5
5	хохол	2/40	5/100
4	Кулик <i>Limicola</i>	4/100	-
3	Цапля <i>Egretta alba, Ardeacinerea</i>	3/100	3 /100
10	Широконоска <i>Anas clypeata</i>	9/90	10 /100
3	Гоголь <i>Bucephala clangula</i>	2/67	2/67 Н7
2	Нырок красноголовый <i>Aythya ferina</i>	1/50	-
1	Выпь <i>Buteo stellaris, Icthyophaga minutus</i>	1/100	-
3	Свиязь <i>Anas penelope</i>	1/30	-
1	Ворона серая <i>Corvus cornix</i>	1/100	1/100
4	Гагара <i>Gavia</i>	3/75	2/50 -Н7
19	Кабан (дикая свинья) <i>Sus scrofa</i>	н/и	4/21-2007 г.***
30		н/и	17/56,7-2008г.; 2009 г.***

Примечание: * - % положительных результатов ТФ ИФА; ** - результаты ТФ ИФА с антигеном гемагглютининоподтипов Н5 и Н7; ***- результаты ТФ ИФА с антигеном вируса гриппа свиней; «н/и» – не исследовали.

Как видно из результатов, представленных в таблице 20 в большинстве случаев серопозитивными оказались представители отрядов гусеобразные

(Anstrifjrmes), ржанковые (Charadriformes), голубеобразные (Columbiformes) и воробьинообразные (Passeriformes) (от 58% до 100%). Результаты исследования, приведенные в таблице 20, свидетельствуют о том, что в (339 сывороток – 66,7%) пробах сыворотки крови от 24 видов птицы обнаружены антитела к вирусу гриппа птиц. Из них 169 - 45,8% (22 видов водоплавающей птицы) имели титр 1:400-6400; в том числе положительными в ТФ ИФА на основе МКА к HA5 и HA7 оказались 22,5% и 12%, соответственно. Результаты были подтверждены в РЗГА с антигенами HA подтипов H5 и H7. Также высокий уровень антител к вирусу гриппа птиц был выявлен в исследованных пробах сыворотокот 5 видов синантропной птицы (сорока, воробей домовый, синица, грач, ворона серая).

Также результаты проведенных исследований показали, что процент выявления положительных проб сывороток крови диких свиней к вирусу гриппа А в период 2006-2007 гг. не превышал 21%. Тогда как в пробах сывороток, присланных в 2008-2009 гг. он значительно возрос составил - 75%. Из них положительными в РТГА оказались: к H1 грипп птиц – 19/69%; к H1 грипп свиней – 18/60%; H9 – 11/36%; H5 – 9/30%; H3 – 3/10%.

Чувствительность непрямого ТФ ИФА составила 97,9%; специфичность 100% так как антитела ни одной из контрольных моноспецифических сывороток к гриппу птиц не взаимодействовали с антигенами гетерологичных вирусов болезней птиц (б. Ньюкасла; ССЯ-76; ИББ).

Антитела к ВБН были обнаружены в 364 (63%) пробах сывороток практически у всех исследуемых видов птиц. 137 (40%) проб имели титр вирусспецифических антител в диапазоне 1:200-1:6400. Причем в отдельных районах он достигал 1:7000-8000.

Процент выявления положительных сывороток у водоплавающей птицы варьировал от 30% (свиязь, соксан) до 100% (утка серая; выпь; цапля; кулик). У синантропной птицы этот показатель находился в пределах 23% (синица большая), 61-100% - голубь сизый, грач, ворона.

Выявление и сезонное повышение уровня специфических антител к вирусам ГП и НБ совпадали с периодами массовых миграций перелетных птиц - весной и осенью – апрель и август-сентябрь, соответственно, а также гнездовым и выводковым периодами - май-июнь.

В число проб, присланных из Алтайского края, входили 119 проб сухих сывороток, нанесенных на фильтровальную бумагу. Высокая чувствительность разработанного непрямого ТФ ИФА позволили выявить антитела к вирусам ГП и НБ в этих пробах сывороток крови птиц. Элюцию антител проводили забуференным физиологическим раствором pH 7,2-7,4 в объеме 0,1 см³. Восстановленные пробы сывороток исследовали в тех же условиях непрямого ТФ ИФА и РТГА. Для определения соответствия титров специфических антител исследовано 24 пробы параллельных сывороток крови птиц различных видов, отобранных в мае 2007 г. в одном и том же месте, районе Алтайского края – Ребрихинском, оз. Чаечное (4); Топчихинский, бол. Пятилетка (4); Тюменцевский, оз. Б. и М. Утечное, Семеновское, Горькое (6); Каменский, оз. Рыбное, пруд Мыски (6); Мамонтовский оз. Горькое, Пахарские бол. (4). В результате проведенных исследований установлено, что уровень антител в элюированных образцах соответствовал титру нативных сывороток в среднем на 80-83% в РТГА и 90-100% в ТФ ИФА (ГП и НБ).

Полученные данные серологического мониторинга, наличие высоких титров специфических антител к вирусам ГП и НБ в сыворотках крови большинства представленных видов птиц и антител к вирусу гриппа А в сыворотках крови диких свиней доказывает, что исследуемые вирусы циркулируют среди популяций животных дикой природы. Полученные данные могут служить подтверждением их участия в возникновении и поддержании очагов инфекции, а также и распространения вируса.

Непрямой ТФ ИФА требует использование антивидового конъюгата, что осложняет применение данного формата ТФ ИФА для выявления антител в

сыворотках крови диких животных. Целесообразнее использовать конкурентный метод ТФ ИФА, не требующий использования антивидового конъюгата или конъюгата белка А, или G. К тому же для проведения конкурентного ТФ ИФА требуется меньшее время постановки реакции, что особенно важно при проведении массовых мониторинговых исследований. Поэтому нами на основе полноразмерного рекомбинантного белка NP (рекNP) вируса гриппа А, полученного в прокариотической системе экспрессии и конъюгата соответствующих МКА разработан конкурентный ТФ ИФА для выявления специфических антител к вирусу гриппа А в сыворотках крови животных. Специфичность рекомбинантного белка NP вируса гриппа А подтверждена его взаимодействием с МКА к нуклеопротеину вируса гриппа, полученными на цельновирионный антиген.

Для определения оптимальной дозы сенсibilизации полистироловых планшет рекNP использовали: меченые МКА клона 1С6 к NP вируса гриппа А в рабочем разведении (1:2000), которое было определено при изготовлении и проведении исследований контроля специфичности и активности изготовленных конъюгатов (п. 4.2.2.3.1); контрольные специфические референс-сыворотки крови птиц к ВГП с различной активностью (K^{++} титр в РЗГА 1:4096; K^{+} титр в РЗГА 1:64) и сыворотки крови интактных птиц в качестве отрицательного контроля (K^{-}) в разведении 1:20.

Таблица 21

Зависимость ОП₄₀₅ контрольных сывороток птиц в разведении 1:20 от дозы сенсibilизации полистироловых планшет рекомбинантным белком NP

Концентр. белка*/ ОП ₄₀₅		Активность сывороток в нТФ ИФА (n=3)							
		2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,015
Сыв. птиц	МКА*	3,4± 0,06	2,5± 0,02	2,3± 0,05	2,25± 0,12	1,7± 0,07	1,0± 0,1	0,9± 0,05	0,3± 0,04
	K ⁺⁺	1,7± 0,04	1,51± 0,06	1,49± 0,02	1,35± 0,05	1,25± 0,04	0,8±0,05	0,4± 0,04	0,27± 0,05
	K ⁺	1,2±0, 05	1,09± 0,05	1,0±0,1	0,92± 0,03	0,37± 0,02	0,21± 0,07	0,2± 0,03	0,2±0,06
	K ⁻	0,2±0, 08	0,18±0, 05	0,18±0,0 3	0,15±0,1	0,17± 0,04	0,18± 0,05	0,2±0,0 3	0,18± 0,04

Примечание: * - концентрация белка мкг/лунку; ** - рабочая доза конъюгата МКА к NP вируса гриппа А

Результаты проведенных исследований, представленные в таблице 20 показали, что максимальное разведение рекомбинантного белка на ФБР рН7,2-7,4, при котором еще обеспечивалась его антигенная активность с обеими положительными сыворотками, соответствовало концентрации белка $NP\ 125$ нг/лунку. В качестве оптимальной дозы для сенсibilизации полистироловых планшет была выбрана концентрация рекомбинантного белка 250 нг/лунку, которая обеспечивала выявление специфических антител как в высокоактивных сыворотках, так и сывороток с низкой активностью. Позитивно-негативный порог (ПНП) определяли по результатам исследований 20 отрицательных сывороток кур в разведении $1:20$. В результате исследований получили среднее значение OP_{405} отрицательных сывороток равное $0,18$. Прибавляя к данной величине два и три значения стандартных отклонений, рассчитали нижнюю и верхнюю границы ПНП, которые составили, соответственно, $0,27$ и $0,31$. В результате проведенных исследований тестирования в конкурентном ТФ ИФА сывороток птиц против гриппа, имеющих различную активность в РЗГА установили, что при OP_{405} $2,25 \pm 0,12$ контроля конъюгата МКА к NP вируса гриппа птиц и OP_{405} $0,045-0,05$ контроля субстрата, сыворотки крови птиц, имеющие OP_{405} $1,5$ и более являются отрицательными, имея менее 30% конкуренции; OP_{405} $1,57-1,35$ – сомнительные, имеющие $30-40\%$ конкуренции; OP_{405} $1,35-0,9$ – слабо положительные - $40-60\%$ конкуренции; OP_{405} $0,85-0,05$ – высоко специфичные, имеющие $65-98,7\%$ конкуренции.

Далее нами проведены исследования определения OP_{405} меченых МКА к NP вируса гриппа птиц в различных вариантах конкурентного ТФ ИФА - при одновременном внесении меченых МКА к NP вируса гриппа птиц и исследуемой сыворотки; – внесение меченых МКА к NP вируса гриппа птиц без удаления исследуемой сыворотки после 40 мин. ее контакта с сорбированным рекомбинантным NP .

Полученные результаты показали, что разница OP_{405} в конкурентном ТФ ИФА при одновременном внесении исследуемой сыворотки и меченых

МКА и после 40 мин. контакта сыворотки с сорбированным рекомбинантным NP без ее удаления, незначительная и составляет $0,06 \pm 0,02$ о.е. Однако второй вариант конкурентного ТФ ИФА позволил сократить время проведения анализа, исключая этап отмывания, без снижения чувствительности и специфичности метода (таблица 22). Данный вариант конкурентного ТФ ИФА сочетает в себе одновременно процесс ингибирования ИФА и конкуренцию меченых МКА и сывороточных антител за связывание со специфическими эпитопами антигена.

Результаты проведенного исследования показали, что прямой конкурентный ТФ ИФА на основе рекомбинантного NP является простым, быстрым и удобным, более экономичным методом, который не уступает нТФ ИФА по чувствительности и специфичности. Использование в качестве специфического антигена полноразмерного рекNP вируса гриппа А и конъюгата соответствующих МКА позволяет выявлять специфические антитела в сыворотках крови всех видов животных, а также сывороток, имеющих низкую активность.

4.2.3.2. Сравнительное изучение чувствительности и специфичности методов ТФ ИФА для выявления антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла

Для сравнительного изучения чувствительности и специфичности разработанных различных форматов ТФ ИФА для выявления специфических антител использовали гипериммунные сыворотки крови к гриппу птиц и болезни Ньюкасла, сыворотки крови птиц, присланные для мониторинговых исследований в ФГБУ ЦНМВЛ (г. Москва). С использованием методов ТФ ИФА - непрямого и конкурентного исследовано 334 пробы сывороток домашней птицы (Можайский район Московской обл.), привитой против гриппа птиц подтипа H5 инактивированной вакциной (Покровский завод биопрепаратов). При проведении исследований сыворотки крови птиц исследовали в одном разведении 1:200, то есть в 4 раза превышающем титр

отрицательной контрольной сыворотки (1:50), имеющей ОП₄₀₅ равную фоновому уровню пероксидазного конъюгата анти IgG кур.

Относительное содержание антител в исследуемых образцах выражали в международных ИФА единицах (EU) и определяли по отношению значения ОП₄₀₅ испытуемой пробы к значению ОП₄₀₅ стандарта по формуле:

EU пробы = [среднее О.П. пробы — среднее О.П. отр. контроля / среднее О.П. стандарта — среднее О.П. отр. контроля] · 100. Интерпретация результатов реакции. При EU пробы ≤ 30 - отсутствие специфических антител (отрицательная реакция); в диапазоне - 30–40 - низкий уровень специфических антител (слабо положительная реакция); 40–65 - выраженный уровень специфических антител (положительная реакция); > 65 - высокий уровень специфических антител (сильная положительная реакция).

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 22.

Таблица 22

Чувствительность и специфичность различных методов ТФ ИФА выявления антител к вирусу гриппа птиц в сыворотках крови животных

Исследуемые сыворотки	Активность исследуемых сывороток (n=3)			
	Международных ЕУ ИФА		ГАЕ	% конкуренции
	Специфические антигены			
	ЭЭЖ ЭК			Rek NP грипп птиц
	нТФ ИФА	ОАО Авивак	РТГА	кТФ ИФА
NS кур	0	0	0	0
SS кур стандарт	100±0,4	100±0,2	512-1024	99±0,3
SS свиней к H5N1**	80±0,4	50±0,1	512-1024	99±0,1
Гиперимунная сыворотка кур к ВНБ*	20±0,6	0	512-1024	0
Гиперимунная сыворотка кур к ВГП	110±0,7	90±0,13	1024-2048	98,3±0,1
Объединенные пробы сывороток крови от диких птиц (Алтайский край)				
Хабарский (n=12) чернеть	±0,3	±0,3	тф400-2048	99,3±0,3
Крутихинский n=10	±0,3	±0,3	1600-2048	9808±0,3
Благовещенский n=10	±0,3	±0,3	100-400	23±0,3
Объединенные пробы сывороток крови кур, привитых инактивированной вакциной (Можайский р-н Московской обл.)				
SS кур (n=10)	20±0,5	17±0,1	0	29±0,3
SS кур (n=20)	10±0,2	16±0,13	0	20±0,2
SS кур реконвалесцент. (n=10)	95±0,5	96±0,15	2048-3200	98,7±0,5
с. Бородино (n=16)	96±0,2	87±0,12	2048-3200	98,5±0,2
с. Иващино (n=10)	98±0,7	93±0,14	2048-3200	99,1±0,1
Троицк (n=30)	85±0,15	79±0,13	256-512	83±0,25
с. Голеново (n=20)	79±0,7	72±0,1	256-512	81±0,2

Примечание: SS ГП– иммунная сыворотка птиц, переболевших ГП; SS НБ- иммунная сыворотка птиц, переболевших НБ
*-в реакциях использовали антиген вируса НБ; ** -для выявления комплекса антиген-антитело использовали конъюгат протеина А

Результаты исследований показали, что разработанные различные форматы ТФ ИФА для выявления специфических антител к вирусу гриппа А являются чувствительными и специфичными методами. Результаты расчета относительного содержания в сыворотках крови АТ в международных единицах (ЕУ) ИФА практически совпадают. По своей чувствительности и специфичности они не уступают коммерческому «Набору для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц» фирмы ОАО НПП «Авивак» Ленинградской области. Применение рекомбинантного белка нуклеопротеина гриппа А в качестве специфического антигена в непрямом ТФ ИФА увеличивает чувствительность метода в 1,5 -2 раза и ведет к снижению фонового уровня, увеличению чувствительности и специфичности метода. Соотношение сигнал/фон выше, в случае использования рекомбинантного белка нуклеопротеина гриппа А в качестве специфического антигена: даже для слабоактивных сывороток крови, имеющих низкие значения ОП₄₀₅: Авивак - 2,4-8,4; непрямой ТФ ИФА– 2,1-6,9; непрямой ТФ ИФА на основе рекомбинантного белка - 3,3-17.

4.2.3.3. Разработка непрямого ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков для выявления специфических антител к вирусу ЛДР

Целью исследований данного раздела являлось изучение возможности применения рекомбинантных аналогов структурных белков NC, Gn/Gc вируса ЛДР, полученных в прокариотической системе экспрессии при разработке тест-систем иммуноанализа для выявления специфических антител к вирусу ЛДР.

Ввиду отсутствия ЛДР на территории РФ и наличия полевых положительных сывороток к ЛДР для изучения чувствительности и специфичности разрабатываемого метода ТФ ИФА использовали сыворотки крови нелинейных белых мышей и линии BALB/c, полученные при экспериментальном заражении аттенуированным вирусом; изучении кинетики развития гуморального ответа в результате иммунизации различными антигенами вируса ЛДР, а также лиофилизированные сыворотки

крови овец, специфичные к вирусу ЛДР; сахарозо-ацетоновые антигены вирусов ЛДР, Найроби, Акабане, Арумовот – представителей семейства *Bunyaviridae* и иммуноасцитические жидкости (ИАЖ) мышей к указанным вирусам, полученные из коллекции музея микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. В качестве специфического антигена использовали неденатурированные препараты рекомбинантных белков NC, Gn/Gc вируса ЛДР, полученных в прокариотической системе экспрессии. Анализ рекомбинантных белков и их аутентичность вирусным белкам определяли методом электрофореза в ДСН-ПААГ с последующим иммуноблоттингом с соответствующими МКА, специфическими ИАЖ и сыворотками овец, полученными к вирусу ЛДР. В качестве препаратов сравнения использовали сахарозо-ацетоновый антиген (САА), полученный из инфицированного мышинового мозгового материала и частично очищенный концентрированный культуральный антиген вируса ЛДР. В качестве антивидового конъюгата использовали пероксидазный конъюгат белка G в разведении 1:3000.

Стандартным методом шахматного титрования [19] определены оптимальные параметры постановки непрямого ТФ ИФА: доза сенсibilизации планшетов рекомбинантным белком; рабочая доза контрольных отрицательной и положительной сывороток; пероксидазного конъюгата МКА к нуклеопротеину вируса ЛДР, антивидового конъюгата.

Оптимальная доза сенсibilизации планшетов в течение 18-20 часов при температуре 4-8°C антигенами на 0,05М КББ pH 9,6 составила: 150 нг/лунку гесNC (разведение 1:2000); 200 нг/лунку гесGn/Gc (разведение 1:1500); разведение 1:200 специфического культурального вирусного антигена; разведение 1:500 САА. В качестве отрицательного контроля использовали гесNP вируса гриппа А, полученный также в прокариотической системе экспрессии. На каждой панели размещали контроли: конъюгата, сывороток - отрицательной в четырех повторностях, положительной в 2 повторностях, исследуемую сыворотку – каждое разведение в 2 повторностях.

Уровень отсечения определяли для каждого рекомбинантного белка, добавляя 2 стандартных отклонения к среднему значению ОП₄₀₅ сывороток крови животных, до иммунизации и отрицательной референс-сыворотки овцы набора РНГА для ЛДР. При определении титров специфических антител исследуемой сыворотки, титром считали наибольшее ее разведение, обеспечивающее $ОП_{405} \geq 0,3 \pm 0,05$.

Также активность сывороток крови в одном разведении определяли по относительному содержанию специфических антител в исследуемых образцах разведении 1:200 для сывороток мышей и 1:80 - овец, - в 4 раза превышающем разведение нормальной сыворотки 1:50 и 1:20, соответственно. Выражали в международных единицах (ЕУ) ИФА и определяли по отношению значения ОП₄₀₅ испытуемой пробы к значению ОП₄₀₅ стандарта по формуле (п.4.2.3.2).

Результаты изучения чувствительности и специфичности непрямого ТФ ИФА на основе рекомбинантных аналогов структурных белков вируса ЛДР представлены в таблице 23.

Результаты, представленные в таблице 23 показывают, что рекомбинантные белки: Gn, Gc, NC вируса ЛДР, полученные в прокариотической системе экспрессии (*E.coli*), специфически взаимодействовали с соответствующими МКА, антителами ИАЖ и специфических сывороток, к нативному вирусу ЛДР (или вирусному антигену), что определяет, их антигенную активность и возможность использования в качестве специфических антигенов при конструировании тест-систем иммуноанализа. Определена перекрестная реактивность: рекомбинантных белков, взаимодействующих как с антителами сывороток, полученными к ним, так и к нативному вирусу (или вирусному антигену); антител сывороток, полученных к рекомбинантным белкам, синтезированным *in vitro* или *in vivo*, взаимодействующих как с соответствующим рекомбинантным белком, так и с нативным вирусным антигеном.

Таблица 23

Активность и специфичность сывороточных антител к вирусу ЛДР, выявленных в непрямом ТФ ИФА на основе рекомбинантных белков, специфических вирусных антигенов

Исследуемые сыворотки, МКА, ИАЖ	Антигены/ концентрация антител в ЕУИФА+ (n=3)								
	ЛДР					САА гетерогенных вирусов			ГриппА recNP
	recGn	recGc	recNC	CAA	Sag	Арумовот	Найроби	Акабане	
SS мышей 7сут.*	57±0,1	43±0,4	0	81±0,2	54±0,3	19±0,4	19±0,12	16±0,2	0
SS мышей 21сут.**	100±0,2	66±0,4	0	103±0,5	106±0,1	16±0,10	0	0	0
SS мышей 85сут.***	215±0,1	110±0,2	0	158±0,5	130±0,4	0	0	0	0
SS мышей инакт. АГ	95±0,4	74±0,2	51±0,5	152±0,6	97±0,2	19±0,4	17±0,12	17±0,6	0
SS мышей жив. в-на	100±0,2	154±0,4	160±0,2	158±0,1	125±0,4	15±0,5	16±0,5	20±0,5	0
SS мышей гипериммун.к в.ЛДР	165±0,4	194±0,2	203±0,1	131±0,4	125±0,5	18±0,5	16±0,4	16±0,7	0
SS овцы К++	145±0,2	134±0,5	220±0,6	100±0,1	85±0,5	0	19±0,2	0	0
ИАЖ к ЛДР	157±0,3	167±0,4	202±0,2	140±0,2	160±0,4	20±0,4	16±0,3	16±0,2	0
ИАЖ _{Арумовот}	15±0,4	0	0	19±0,2	20±0,4	184±0,7	18±0,1	19±0,5	0
ИАЖ _{Найроби}	16±0,3	17±0,3	0	16±0,2	18±0,5	18±0,1	269±0,4	17±0,13	0
ИАЖ _{Акабане}	17±0,4	15±0,1	0	18±0,3	16±0,5	0	15±0,3	161±0,12	0
МКА 4В4 к Gn ЛДР	210±0,1	0	0	104±0,2	160±0,4	0	0	0	0
МКА 2D12 к NC ЛДР	0	0	340±0,1	230±0,4	160±0,2	29±0,1	0	0	0
МКА 1С6 к NP гриппа А	0	0	0	0	0	0	0	0	267±0,2
С овцы К-	0	0	0	15±0,1	18±0,5	19±0,2	0	0	0
С мышей К-	0	0	0	18±0,2	0	0	0	15±0,3	0

Примечания: ЕУ ИФА+ - в таблице приведены данные концентрации антител в международных единицах ИФА; 0– обозначен уровень антител <15 ЕУ ИФА; * - ** - *** - соответственно 1-, 2- и 3-кратная ДНК-иммунизация рекомбинантными плазмидами, кодирующими гликопротеины Gn/Gc вируса ЛДР.

Результаты, представленные в таблице 23 показывают, что рекомбинантные белки: Gn, Gc, NC вируса ЛДР, полученные в прокариотической системе экспрессии (*E.coli*), специфически взаимодействовали с соответствующими МКА, антителами ИАЖ и специфических сывороток, к нативному вирусу ЛДР (или вирусному антигену), что определяет, их антигенную активность и возможность использования в качестве специфических антигенов при конструировании тест-систем иммуноанализа. Определена перекрестная реактивность: рекомбинантных белков, взаимодействующих как с антителами сывороток, полученными к ним, так и к нативному вирусу (или вирусному антигену); антител сывороток, полученных к рекомбинантным белкам, синтезированным *in vitro* или *in vivo*, взаимодействующих как с соответствующим рекомбинантным белком, так и с нативным вирусным антигеном. Полученные результаты изучения аналитической чувствительности нТФ ИФА на основе рекомбинантных белков: Gn, Gc, NC вируса ЛДР показали отсутствие их перекрестной реактивности с антителами к гетерологичным вирусам болезни Найроби, Акабане, Арумовоти гриппа А.

Так же результаты, представленные в таблице 23 свидетельствуют, что ОП₄₀₅ и концентрация антител в сыворотке крови после заражения вирусом ЛДР или вакцинации живой вакциной в 2,5-4 раза превышает таковые сывороток крови животных, привитых инактивированной вакциной. Используя *resNC* в непрямом ТФ ИФА в качестве специфического антигена, возможна дифференциация инфицированных животных и иммунизированных вакциной, содержащей нереплицирующийся вирус ЛДР (инактивированной; субъединичной и ДНК-вакциной на основе гликопротеинов вируса).

Аналитическую чувствительность непрямого ТФ ИФА на основе *resNC*, *resGn*, *resGc* определяли при изучении динамики образования и накопления специфических антител, в том числе нейтрализующих в результате иммунизации различными иммуногенами – прототипами

различных типов вакцин (таблица ДНК-иммуниз и различных вакцин). Оценка аналитической чувствительности метода показала, что специфические антитела к вирусу ЛДР в результате иммунизации рекомбинантной ДНК, аттенуированным вирусом могут быть выявлены на детектируемом уровне на 7 сутки после внутримышечного введения препарата и на 10-14 сутки после введения инактивированного антигена.

Сравнительное изучение чувствительности непрямого ТФ ИФА и реакции нейтрализации (РН) для выявления специфических антител к вирусу ЛДР представлено в таблице 24. Для проведения анализа использовали сыворотки овец, иммунизированных аттенуированным вирусом (титр в РН 1:64 - К+) и после контрольного заражения (титр в РН 1:128 - К++); сыворотки мышей, иммунизированных аттенуированным вирусом ЛДР (с титром в РН 1:8 и 1:16), инактивированным антигеном вируса ЛДР (с титром в РН 1:4), отобранные в различные сроки после введения препаратов.

Таблица 24

Уровни вируснейтрализующих и вирусспецифических антител против ЛДР, полученные при исследовании сывороток крови овец и мышей в РН и непрямым ТФ ИФА на основе рекомбинантного белка NP

Титр в РН	Активность сывороток ОП ₄₀₅ /кол-во положительных сывороток (n=5)							
	Разведения сыв-к, непрямо ТФ ИФА на основе рекNP							
	50	100	200	400	800	1600	3,2т.	4,8т.
4	2,1±0,05/9	0,2±0,03/1	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
8	2,5±0,05/10	1,2±0,04/2	0,25±0,01/10	0,145±0,01/10	н/и	н/и	н/и	н/и
16	н/и	н/и	2,1±0,02/10	1,8±0,03/7*	2,4±0,07/5*	0,15±0,05/10	н/и	н/и
32	н/и	н/и	3,2±0,07/10	2,9±0,01/10	3,4±0,06/10	2,7±0,03/8*	1,7±0,03/1	0,22±0,1/10
64	н/и	н/и	н/и	3,8±0,07/9	3,2±0,04/10	2,8±0,07/9	2,2±0,04/5	1,4±0,03/3
128	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	4,7±0,04/10	4,2±0,04/10	2,3±0,05/10
NS	0,2±0,05	0,15±0,01	0,15±0,01	0,17±0,01	0,14±0,01	0,12±0,01	0,14±0,01	0,15±0,01

Примечание: * - остальные сыворотки имели ОП₄₀₅ не превышающую верхнюю границу ПНП.

Результаты, представленные в таблице 24 показали, что сыворотки имеющие титр антител в РН ниже значения 1:16 оказались отрицательными в

непрямом ТФ ИФА на основе гесNC. Разница в чувствительности ИФА и РН может быть объяснима различием определяемых антител: в РН – вируснейтрализующих антител, в непрямом – вирусспецифических. Низкие титры антител в сыворотках крови животных, иммунизированных инаktivированным антигеном в нТФ ИФА на основе гесNC, могут быть объяснимы концентрацией нуклеопротеина, входящего в состав инаktivированного антигена и отсутствием его репликации в организме реципиента. Что может служить критерием дифференциации инфицированных животных и привитых вакциной, содержащей нереплицирующийся вирус ЛДР.

Таким образом, проведенные исследования показали, что рекомбинантные белки, полученные в прокариотической системе экспрессии могут быть использованы в качестве специфического антигена при конструировании тест-систем иммуноанализа, так как антитела сывороток и иммуноасцитических жидкостей, полученных на цельновирионные антигены вируса ЛДР специфически взаимодействовали с рекомбинантными белками Gn, Gc и NC. Использование рекомбинантных белков в качестве специфических диагностических реагентов гарантирует безопасность, стандартность, высокую специфичность и низкий фоновый уровень разрабатываемых тест-систем иммуноанализа. Разработанные методы иммуноанализа являются высокочувствительными, надежными методами и могут быть использованы для диагностики ЛДР, серологических исследований.

4.3. Современные подходы создания эффективных безопасных вакцин и стратегии вакцинации против особо опасных инфекций (на примере лихорадки долины Рифти гриппа птиц подтипа H5)

4.3.1. Обоснование выбора штамма вируса лихорадки долины Рифт

Высокая опасность для человека возбудителя ЛДР и, следовательно, опасность использования вирулентного штамма для производства инактивированной вакцины против ЛДР в угрожаемой зоне поставила перед нами задачу выбора штамма для обеспечения безопасности производства в перспективе создания и применения эффективных средств специфической профилактики этой болезни.

4.3.1.1. Иммунобиологические свойства вируса лихорадки долины Рифт

Нами проведено изучение иммунобиологических свойств штаммов вируса ЛДР, имеющих в коллекции музея микроорганизмов ВНИИВВиМ. С целью изучения чувствительности и уровня накопления вируса ЛДР в организме аутбредных белых мышей различных возрастных групп и золотистых хомячков массой 100 г, животных заражали в дозе 10^3 MLD_{50/см3} вирусами штаммов: «RVF/2002/09/ПС»; «RVF(s)113»; «1974-ВНИИВВиМ»; пантропным вирусом штамм «Энтеббе». Полученные результаты представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Чувствительность белых мышей и золотистых хомячков к вирусу лихорадки долины Рифт

n=3

Животные	Штаммы вируса ЛДР, титры инфекционной активности lgMLD _{50/см3}			
	RVF/2002/09/ПС	RVF(s)113	1974-ВНИИВВиМ	Энтеббе
Белые мыши 1-3 дн.	8,3-8,75	8,0-8,75	8,7-8,9	7,5-8,25
время гибели (час.)	36-72			36-48
Белые мыши 25-30 дн.	7,18-7,25	7,25-7,5	7,5-8,0	7,78-8,5
время гибели (час.)	48-144			48-72
Белые мыши 20-25 грамм	6,75-7,25	6,25-7,25	5,7-6,25	7,5-8,0
время гибели (час.)	144-168			72-144
Золотистые хомячки массой 100 грамм	н/и	н/и	6,75-7,25	8,0-8,5
время гибели (час.)			72-96	36-72

Представленные в таблице 25 данные свидетельствуют, что исследуемые штаммы вируса ЛДР способны размножаться в организме белых мышей, золотистых хомячков. Наиболее чувствительной моделью к вирусу ЛДР оказались мыши 1-3 дневного возраста. Гибель мышей этого возраста отмечали на 2-3 сутки после внутримозгового заражения. Первые признаки болезни в виде клонических судорог появлялись через 12-24 часа после заражения, затем к 48-72 часам отмечали нарастание тонических судорог, парезы, параличи конечностей и гибель животных в течение 2-3 часов после начала проявления клинических признаков. Нейротропный штамм «1974-ВНИИВВиМ» вируса не вызывал гибели мышей массой 18-20 г и мышей 25-30 суточного возраста при парентеральном введении; индуцировал образование специфических антител, которые выявляли, начиная с 5-7 суток, в непрямом ТФ ИФА, в РЗНГА.

Штамм «Энтеббе» обладал высокой вирулентностью для мышей и хомячков. Инкубационный период не превышал 36-48 часов. Отмечали взъерошенность шерстного покрова, отказ от корма, малоподвижность, сгорбленность. Гибель животных наступала в период от 36 часов до 5-7 суток в зависимости от возраста животного. Отмечена специфическая гибель самок при поедании ими инфицированного приплода. Самки погибали в течение 6-7 суток. Специфичность их гибели была подтверждена в РНГА, ТФ ИФА на основе МКА к нуклеопротеину вируса ЛДР. В клетках, в которых находились мыши, инфицированные нейротропными штаммами, гибели самок при поедании ими инфицированного приплода отмечено не было.

Уровень виремии при заражении белых мышей вирулентным вирусом составлял от 4,5-7,25 lg MLD_{50/см3} на 2-3 сутки после введения до 5,5-6,5 lg MLD_{50/см3} на 4-6 сутки. Продолжительность виремии составляла от 2 до 7 суток с момента заражения. 100% гибель в течение 2-6 суток после заражения отмечали у белых мышей массой 18-20 г и мышей 25-30 суточного

возраста. При вскрытии животных обнаруживали острый некротизирующий гепатит, энцефалит. У животных, погибших на 2-3 сутки, отмечали признаки некротического гепатита; у мышей, погибших в более поздние сроки (5-6 суток) – признаки геморрагического диатеза в виде кровоизлияний в селезенке, кишечнике, головном мозге и развитие энцефалита с поражением задней части головного мозга до панэнцефалита. При заражении золотистых хомячков пантропным вирусом ЛДР поражение (гепатоцеллюлярный некроз) печени являлось патогномоничным признаком, подобно таковому у мышей, но с более быстрым течением и отсутствием поражения ЦНС, характерного для белых мышей при заражении вирулентным вирусом ЛДР. Уровень виремии на 2-4 сутки составлял $8,0-8,7 \lg \text{MLD}_{50/\text{см}}^3$. В пробах паренхиматозных органов вирусный антиген выявляли в пределах $5,9-7,5 \lg \text{MLD}_{50/\text{см}}^3$; нейротропный вирус при парентеральном и интрацеребральном методах заражения не вызывал гибели золотистых хомячков массой 100 г.

Полученные результаты свидетельствуют, что использование аттенуированного штамма вируса ЛДР в перспективе для разработки эффективной инактивированной вакцины против ЛДР в эпидемиологическом отношении менее опасного, чем вирулентный штамм, способно решить проблему безопасности производства и применения данной вакцины в угрожаемой зоне. Высоковирулентный штамм «Энтеббе» может быть использован для контроля протективных свойств инактивированного антигена и готового препарата путем заражения иммунизированных животных.

4.3.1.1.2. Культуральные свойства вируса лихорадки долины Рифт

Вопросы культивирования возбудителя, являются одним из основных этапов получения антигенной массы для изготовления инактивированной вакцины. Успех зависит от выбора чувствительной культуры клеток, условий и метода культивирования.

Целью данного раздела работы являлось изучение репродукции вируса ЛДР и подбор культур клеток, обеспечивающих максимальное накопление антигенной активности вируса. Для этого нами проведены исследования по определению уровня накопления инфекционной активности изучаемых штаммов вируса в течение 96 часов культивирования в культуре клеток ВНК-21/13. Результаты исследований представлены в таблице 26.

Таблица 26 - Инфекционная активность вирусосодержащего материала различных штаммов вируса ЛДР полученного в культуре клеток ВНК-21/13

Культура клеток	Штаммы вируса ЛДР/титры инфекционной активности lgТЦД _{50/см3} (n=3)			
	RVF/2002/09/ПС	RVF(s)113	1974-ВНИИВВиМ	Энтеббе
ВНК-21/13 (23пассаж)	6,75-7,25	6,0-6,75	6,75-7,25	5,7-6, 75

Результаты изучения процесса культивирования штаммов вируса ЛДР в перевиваемой линии клеток ВНК-21/13 показали, что пантропный штамм «Энтеббе» способен размножаться в культуре клеток без предварительной адаптации и накапливался в пределах 5,5-6,75 lg ТЦД_{50/см3}. Вирус ЛДР аттенуированных штаммов «RVF(s)113»; «1974-ВНИИВВиМ» и «RVF/2002/09/ПС» накапливался в культуре клеток в высоких титрах инфекционной активности, практически в одинаковых пределах – 6,5 – 7,5 lg ТЦД_{50/см3}. Результаты сравнительного изучения накопления инфекционной и антигенной активности вирусосодержащего материала в зависимости от вирулентности вируса ЛДР показаны на примере штаммов «1974-ВНИИВВиМ» и «Энтеббе» и представлены на рисунке 18

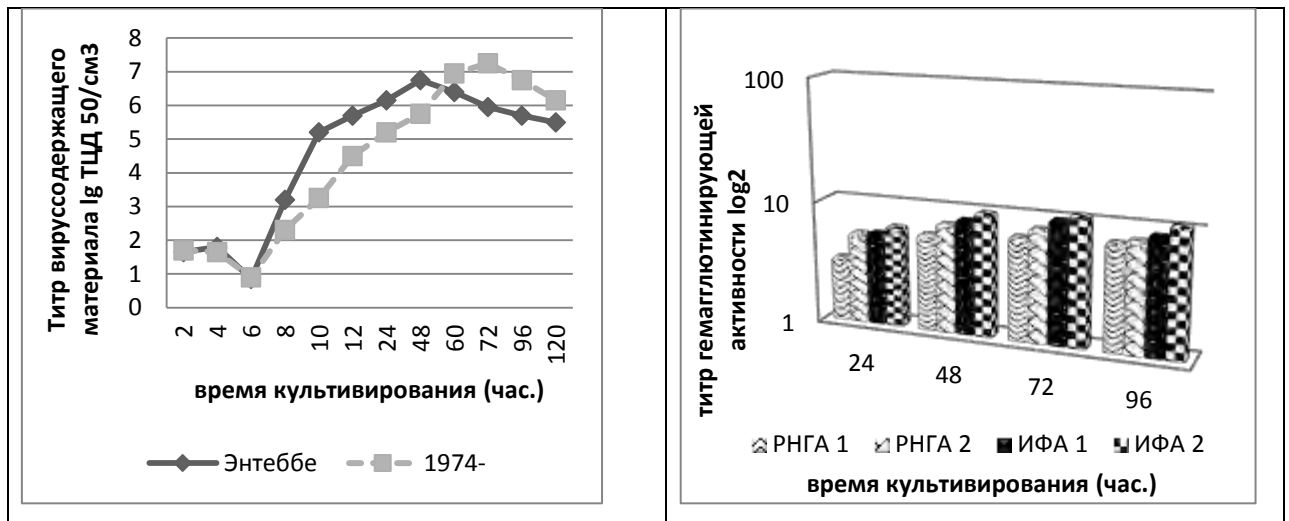


Рис. 18 – Динамика накопления инфекционной и антигенной активности вируса ЛДР штаммов «Энтеббе» и «1974-ВНИИВВиМ», в культуре клеток ВНК-21/13 при стационарном методе культивирования. Примечание: результаты серологических реакций - РНГА1, ИФА1 со штаммом «Энтеббе»; РНГА2, ИФА2 со штаммом «1974-ВНИИВВиМ».

Результаты проведенных исследований, представленные в таблице 26 и на рисунке 18, показали, что штамм «1974-ВНИИВВиМ» не уступает вирулентному штамму по накоплению инфекционной и антигенной активности в процессе культивирования в перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13.

Для дальнейших исследований нами был отобран штамм «1974-ВНИИВВиМ» по следующим признакам: штамм генетически стабилен; адаптирован к росту в культурах клеток с титром инфекционной активности не ниже $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$; безвреден для мышей при парентеральном введении, высокоиммуногенен – вызывает синтез специфических антител в организме привитых животных.

При отработке оптимальной множественности заражения культур клеток выявлено, что заражение высокой множественностью $5 \text{ТЦД}_{50/\text{кл}}$ и выше приводит к задержке (или отсутствию) проявления ЦПД в течение 5-7 суток (срок наблюдения); тогда как при множественности заражения $0,5 \text{ТЦД}_{50/\text{кл}}$ и ниже дегенерация клеток и монослоя отмечается, начиная с 36-48 часов культивирования. Это подтверждает наличие феномена фон Магнуса у вируса ЛДР, приводящего к накоплению интерферирующих дефектных

частиц и снижению инфекционной активности вируса в результате проведенных исследований определено, что оптимальной множественностью заражения является 0,01-0,001 ТЦД_{50/кл}.

Далее нами изучена чувствительность наиболее распространенных линий культур клеток к вирусу ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» в стационарных условиях культивирования. Заражение культур клеток проводили с множественностью заражения 0,01 ТЦД_{50/кл} вирусосодержащим материалом 5 пассажа в соответствующей культуре. Пробы культуральной жидкости для определения инфекционной и антигенной активности отбирали каждые 12-24 часа. Результаты исследования представлены в таблице 27.

Таблица 27

Чувствительность культур клеток к вирусу ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ»

Культура клеток	Время появления ЦПД (час)	Время максимального накопления (час)	Титр инфекционной активности (lgMICLD _{50/см3}) (n=3)	Антигенные свойства (РНГА/ТФ ИФА log ₂) (n=3)
ВНК-21/13	36-48	60-72	6,5±0,2	7,5±0,17/10,5±0,4
ПС	36-48	72-96	6,9±0,14	7,4±0,21/10,5±0,3
ПЯ	48-60	72-96	6,7±0,32	7,8±0,5/10,3±0,1
CV-1	48-96	96-120	6,5±0,25	6,9±0,4/9,7±0,28

Результаты исследования показали, что наибольший «урожай» вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» получали при заражении суточной культуры клеток; отобранные линии клеток ВНК-21/13 и ПС оказались более чувствительными к вирусу ЛДР и накопление вируса в них происходило в более ранние сроки, чем в культуре клеток CV-1. Постепенное увеличение титра инфекционной активности при множественности заражения 0,01-0,001 ТЦД_{50/кл} наблюдали до 60 часов культивирования. К 60-72 часам происходило максимальное накопление вируса, значения которого сохранялись до 96-120 часов культивирования.

Последовательность и характер деструкции клеток зависели от особенности онтогенеза вируса, чувствительности культуры клеток, степени

адаптации штамма вируса к культуре клеток. Наличие отчетливо видимого под световым микроскопом развития ЦПД отмечали через 36-48 часов после заражения в виде округления, сморщивания клеток, появления зернистости цитоплазмы, пикноза ядра, гибели клеток и отслаивания их от субстрата. Часть клеток приобретала звездчатую форму и сохраняла цитоплазматические связи в виде отростков с соседними клетками (рисунок 13). Через 72 часа (90-120 часов CV-1) культивирования отмечали практически полную дегенерацию клеток монослоя и его деструкцию. На ранних стадиях репродукции вируса (8-10 часов после заражения) выявляли неструктурный белок NSs- при электронной микроскопии в ядре инфицированных клеток в виде нитей фибрилл; методом ИЦХ анализа в виде внутриядерного специфического окрашивания (Рисунки 15 и 14). Этот феномен является отличительной чертой вируса ЛДР, по сравнению с другими представителями рода москитных лихорадок.

Для дальнейшей работы по определению оптимальных условий культивирования вируса ЛДР различными методами отобраны культуры клеток ВНК-21/13 и ПС.

Изучение влияния значений pH на накопление вируса ЛДР показало, что сдвиг pH в кислую сторону – 6,6-7,0 в период часовой адсорбции и щелочную 7,2-7,6 при дальнейшем культивировании, позволяет увеличить титр вирусосодержащего материала на 1,5-2 lg.

Известно, что снижение температуры культивирования инфицированной культуры обеспечивает стабилизацию pH поддерживающей среды, сохранение антигенной активности вируса и снижение риска реверсии вирулентных свойств вируса. К тому же вирус ЛДР чувствителен к изменениям pH в узком диапазоне от 6,5 до 7,6. В связи с этим нами изучено влияние понижения температуры культивирования до 34°C на сроки и уровень накопления инфекционной и антигенной активности вируса. Результаты сравнительного изучения динамики и максимального накопления инфекционной и антигенной активности вируса при температуре

инкубирования 37°C и 34°C не выявили значительных отличий. Однако при температуре инкубирования 34°C не было необходимости коррекции pH 7,2-7,4 поддерживающей среды в процессе культивирования в течение 72 часов.

Таким образом, в результате проведенных исследований отработан оптимальный режим культивирования: оптимальная доза заражения культур клеток 0,1-0,01 ТЦД_{50/кл}; в период часовой адсорбции и первых 12 часов инкубирования вируса ЛДР оптимальное значение pH должно находиться в пределах 6,6-7,0. Поддержание pH в пределах 7,2-7,6 в течение последующих 48-72 часов культивирования стационарным методом при 34°C обеспечивало максимальное накопление вируса до 7,5-8,7 lgMICLD_{50/см3}. Изучение антигенной активности вирусосодержащего материала, полученного при разных температурах культивирования, показало, что она практически не отличалась: гемагглютинирующая активность составила 1:64-1:128; в ТФ ИФА на основе МКА к нуклеокапсидному белку-1:512-1:1024.

Культивирование вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» роллерным методом в культуре клеток ВНК-21/13 при следующем режиме культивирования: скорость вращения – 12-15 об/час, оптимальная доза заражения 0,01 ТЦД_{50/кл}, температура – 34°C, pH 7,2-7,6 позволило получить через 48-72 часа вирусосодержащий материал с инфекционной активностью 8,5-8,9±0,2 lg MICLD_{50/см³}, с активностью в РНГА - 1: 128-256, в ТФ ИФА – 1:625-3125. Показано, что уже через 10-12 часов после заражения культуры клеток удавалось выявить ИЦХ методом антигены вируса. В частности NC и Gn/Gc, в виде отдельных специфически окрашенных гранул в цитоплазме инфицированных клеток и перинуклеарной зоны, соответственно, (рисунок 14, В и Е). Через 30 часов инкубирования практически в 50% инфицированных клеток выявляли антиген NC по всей поверхности цитоплазмы; гликопротеины Gn/Gc – специфическое окрашивание на одном из полюсов клетки (рисунок 14, С и F).

Таким образом, полученные результаты исследования показали, что уровень накопления вируса ЛДР аттенуированного штамма

«1974- ВНИИВВиМ» при роллерном методе культивирования в культуре клеток ВНК-21/13 составил: инфекционной до 8,5-8,9 lg MICLD_{50/см3} и антигенной активности 1:625-1:3125 в ТФ ИФА, 1:128-1:256 в РНГА, что на порядок выше показателей при стационарном методе.

Суспензионный метод культивирования вируса ЛДР

Изучение возможности культивирования вируса ЛДР в суспензии линии клеток ВНК-21/13 проводили в культуральных сосудах объемом 0,5 и 5,0 дм³ на роллерной установке при линейной скорости вращения бутылей – 310-350 см/мин, (угловая скорость вращения 12-20 об/мин) и в культиваторах объемом 3,0 дм³. При культивировании вируса в бутылках аэрацию поддерживающей среды не проводили. При получении вирусосодержащего материала в культиваторах аэрацию проводили поверхностным наслоением воздуха со скоростью 2 дм³/ч. рН среды поддерживали в пределах 7,2-7,6. Оптимальная концентрация клеток в суспензии, обеспечивающая максимальный выход вируса на единицу объема составила 0,7-2 млн.кл/см³, доза заражения составляла 1,0-0,1 ТЦД_{50/см3}. Культивирование вируса проводили в течение 72 часов до появления в суспензии 80-90% мертвых клеток. Максимальное накопление инфекционной активности вируса к этому периоду составляло 8,0-8,33 lg MICLD_{50/см3}, антигенная активность вирусного сырья находилась в пределах 1:512-1:2048 в ТФ ИФА, 1:128-1:256 в РНГА. Результаты сравнительного изучения уровня накопления инфекционной и антигенной активности вируса при различных методах культивирования представлены на рисунке 19.

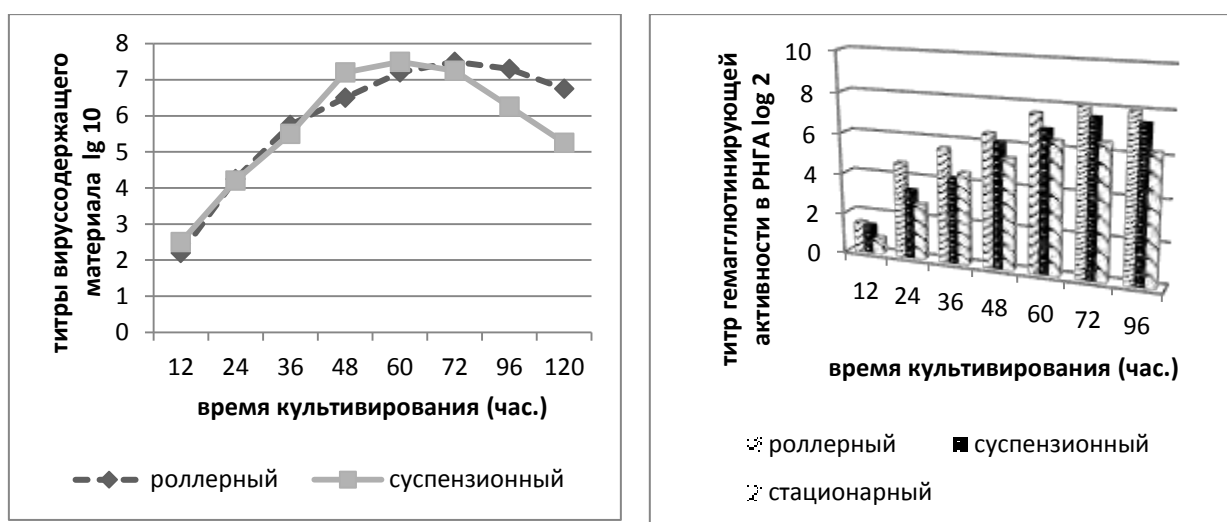


Рисунок 19 – Инфекционная и антигенная активность вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» при различных методах культивирования.

В результате проведенных исследований установлено, что накопление практически одинакового уровня инфекционной активности вируса штамма «1974-ВНИИВВиМ» происходит к 48-60 часам при суспензионном и к 60-72 часам при роллерном методах культивирования. Накопление антигенной активности несколько выше при роллерном методе, и она сохраняет свое значение еще в течение последующих двух суток культивирования (срок наблюдения).

Таким образом, в зависимости от требуемых для изготовления инактивированной вакцины объемов вирусосодержащего сырья, его получение можно осуществлять, используя роллерный или суспензионный методы культивирования, которые в данном случае культивирования вируса ЛДР штамма «1974-ВНИИВВиМ» в культуре клеток ВНК-21/13 показали практически идентичные результаты могут быть использованы в перспективе при разработке эффективной инактивированной вакцины против ЛДР.

4.3.1.3. Молекулярная характеристика штаммов вируса лихорадки долины Рифт

Согласно данным литературы вирус ЛДР имеет один серо- и иммунотип однако изоляты и штаммы вируса отличаются по вирулентности

и тропизму [161; 221]. Дифференциация их по этим признакам важна для определения циркуляции полевого вируса в угрожаемых по ЛДР районах (зонах) и при оценке эпизоотологической ситуации. Одним из критериев дифференциации штаммов по этим признакам является изменения в последовательности нуклеотидов в сайтах рестрикции *nss*-гена.

Расщепление отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размер которых соответствует расположению сайтов рестрикции. Нами с целью определения молекулярной характеристики штаммов вируса ЛДР проведена разработка и оценка эффективности метода выявления и дифференциации изолятов (штаммов) вируса лихорадки долины Рифт на основе полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа. Для этого совместно с Хухоровой И.Ю. с соавторами провели комплекс исследований, включающий: подбор специфических праймеров; оптимизацию условий постановки ПЦР; оценку специфичности и чувствительности метода, а также - рестрикционный анализ генома вируса. Подобранны праймеры комплементарные участку S – сегмента РНК, кодирующему неструктурный белок NSs всех исследованных штаммов вируса, расположенные в нуклеотидных позициях с 203 по 818 нуклеотид (прямой-внешний E-31 и обратный – внешний E-32); с 388 по 670 нуклеотид (прямой-внутренний E-33 и обратный-внутренний E-34), ограничивая продукты амплификации размером 615 п.о. и 282 п.о., соответственно. Рассчитанные пары праймеров позволили синтезировать специфический продукт с помощью двух раундов ПЦР.

Для проведения рестрикционного анализа продуктов ПЦР с целью выявления индивидуальных характеристик генома различных штаммов вируса ЛДР исследовано более 20 различных ферментов. Полученные в процессе амплификации ПЦР-продукты различных штаммов были рестрицированы по EcoRI, XbaI, HaeI, MaeI, MboI и HaeIII. Установлено, что фрагменты генов всех изученных штаммов имеют сайты для перечисленных рестриктаз. С использованием отобранных рестриктаз VneI, PstI и PaeI были

исследованы имеющиеся в нашем распоряжении эпизоотический и аттенуированные штаммы вируса.

Профили рестрикции для испытуемых штаммов сравнивали с результатами расщепления ПЦР-продукта контрольной плазмиды, имеющей вставку *nss*-гена S-сегмента и являющейся маркерной последовательностью при проведении ПЦР и рестрикционного анализа. Родство штаммов оценивали по наличию сайтов и сходству профилей рестрикции с контрольным образцом и испытанными ранее штаммами. Результаты рестрикционного анализа штаммов вируса ЛДР приведены в таблице 28.

Таблица 28

Результаты рестрикционного анализа ПЦР-продуктов испытуемых штаммов вируса ЛДР

N п/п	Штаммы								
	Энтеббе			1974-ВНИИВВиМ			«RVF(s)113»		
	VneI	PstI	PaeI	VneI	PstI	PaeI	VneI	PstI	PaeI
1	421п.о.	408п.о.	421п.о.	-	-	-	-	-	432п.о.
2	200 п.о.	213 п.о.	200 п.о.	-	-	-	-	-	189п.о.

Результаты, представленные в таблице 28 показывают, что рестрицированные препараты обнаружили характерный для каждого штамма дискретный набор фрагментов, соответствующий по суммарному размеру продукта амплификации 621 п.о.

ПЦР-продукт, полученный на матрице РНК эпизоотического штамма «Энтеббе» вируса ЛДР имел два уникальных сайта для рестриктаз VneI и PstI, расщепляющие полученный ПЦР-продукт на два фрагмента, которые имели размеры 421 и 200 п.н., а рестриктаза PstI – на два фрагмента, размеры которых составляли 408 и 213 п.о.

Анализ более 30 опубликованных в GenBank (USA) последовательностей S-сегмента генома с использованием компьютерных программ Visual Cloning (Reda Soft), Vector NTI, Bio Edit показал, что для

всех вирулентных штаммов вируса ЛДР характерно, наряду с общими сайтами, наличие дифференцирующего сайта VneI.

Сравнительный рестрикционный анализ показал отсутствие подобных сайтов рестрикции у аттенуированных штаммов «1974-ВНИИВВиМ», «RVF(s)113» и «RVF/2002/ПС/09» вируса ЛДР, что свидетельствует об отличии нуклеотидной последовательности на данном участке гена. Обнаружено, что у аттенуированных штаммов наличие и расположение сайтов PstI и PaeI варьировало. Так ПЦР-продукты, изучаемой области генома штаммов «RVF(s)113» и «RVF/2002/ПС/09» имели уникальный сайт рестриктазы PaeI, которая разрезает его на два отрезка, размерами 432 и 189 п.о. Этот сайт отсутствовал у аналогичных образцов аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ», что может служить генетическим маркером штамма и позволяет дифференцировать его от других штаммов вируса ЛДР.

Для изучения молекулярной характеристики штамма проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мРНК М- и S-сегментов штамма «1974-ВНИИВВиМ» с первичной структурой штаммов «Кения 57», «Smithburn's» и «Энтеббе» вируса лихорадки долины Рифт, опубликованных в GenBank («Smithburn»- DQ380193 (segment M) и DQ380157 (segment S), (*n*-ген gb:DQ380157.1); «Энтеббе» (*n*-ген gb:DQ380156.1), *gn*-гена 87622773; «Кения 57» (*n*-ген gb:DQ380155.1), *gn*-гена 87622775. Проведено корректирование, совмещение и множественное выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей. В результате проведенных исследований установлено, что штамм «1974-ВНИИВВиМ» в *n*-гене, кодирующем наиболее консервативный нуклеокапсидный белок (NC), по сравнению со штаммами «Кения 57» и «Энтеббе» имел 3 замены: уникальную в положении 159 глутаминовой кислоты на глицин и 2 идентичные со штаммом «Smithburn's»- в положении 207 серин на аспарагин и 219 аргинин на лизин. Результаты представлены на рисунке 20.



Рис. 20 –Секвенирование *n*-гена S-сегмента РНК, кодирующего нуклеопротеин (N) вируса ЛДР штаммов «Энтеббе», «Smithburn's», «Кения-57» и «1974-ВНИИВВиМ». Сплошная линия - замена, характерная для штамма «1974-ВНИИВВиМ»; пунктирная линия – нуклеотидные замены, общие для изученных аттенуированных штаммов.

Результаты, представленные на рисунке 20 свидетельствуют о высоком консерватизме белка нуклеопротеина вируса ЛДР. Основные многочисленные изменения отмечены в S-сегменте РНК на участке *nss*-гена, кодирующем неструктурный белок NSs—основного фактора вирулентности штаммов вируса ЛДР (результаты не показаны). Однако они не затрагивают консервативные участки в положении: 2101; 2102; 2241 и 2257 важные для сохранения 3-мерной структуры белка и образования нитевидных внутриядерных фибрилл, о чем свидетельствуют результаты электронной микроскопии и ИЦХ ИФА (рисунок 15 G, рисунок 14A).

В сравнении со штаммом «Энтеббе» на участке *gn*-гена М-сегмента у штамма «Smithburn's» выявлено 15 нуклеотидных замен, у штамма «1974-ВНИИВВиМ» - 7 единичных замен, расположенных в положении 762AC→TG; 843 T→C; 1875A→G; 1898CC→TT; 1931 T→C; 1936G→A; 1955A→G. Причем нуклеотидные замены в положениях 843 T→C и

1931 Т→С отмечали у всех изученных аттенуированных штаммов вируса ЛДР – «Smithburn's», «RVFv113» и «RVF2002/ПС/09». Результаты представлены на рисунке 21.

1. Штаммы: «Энтеббе», RVF(s)113, «1974-ВНИИВВиМ», RVF 2002/09/ПС



2. Штаммы: 1.«Энтеббе», 2.«Smithburn's», 3.«Кения-57» и 4.«1974-ВНИИВВиМ»

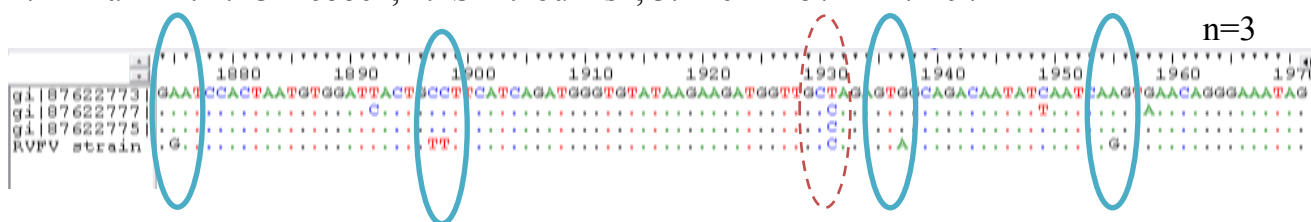


Рис. 21 - Секвенирование участка *gn*-гена М-сегмента, кодирующего гликопротеин Gn вируса ЛДР штаммов «Кения-57», «Smithburn's», «RVFv113», «RVF2002/ПС/09», «1974-ВНИИВВиМ» в сравнении со штаммом «Энтеббе».

Сплошная линия - нуклеотидные замены на участке *gn*-гена штамма «1974-ВНИИВВиМ» и «RVF2002/ПС/09»; пунктирная линия – нуклеотидные замены, общие для изученных штаммов.

Выявленные в процессе исследований нуклеотидные замены являются синонимичными и не затрагивают: эпитопы, ответственные за синтез вируснейтрализующих антител, о чем свидетельствовала вируснейтрализующая активность сывороточных антител, полученных в результате иммунизации рекомбинантными ДНК, кодирующими гены гликопротеинов Gn/Gc вируса ЛДР; сигнальный домен транспортировки гетеродимера Gn/Gc в аппарат Гольджи белка Gn, как показали результаты ИЦХ ИФА (рисунок 14). В перспективе разработки инаktivированных вакцин против ЛДР наличие определенного меньшего числа аминокислотных замен в антигенных эпитопах гликопротеина Gn штамма «1974-ВНИИВВиМ»,

нежели у других аттенуированных штаммов: «Smithburn's», «RVF(s)113» и «RVF/2002/09/ПС» важно при выборе кандидатного штамма.

Таким образом, в результате проведенных исследований и в соответствии рекомендациям МЭБ (Chapter 2.1.8.с., Мануал 2012) нами в качестве кандидатного для дальнейшей работы отобран штамм «1974-ВНИИВВиМ» вируса лихорадки долины Рифт.

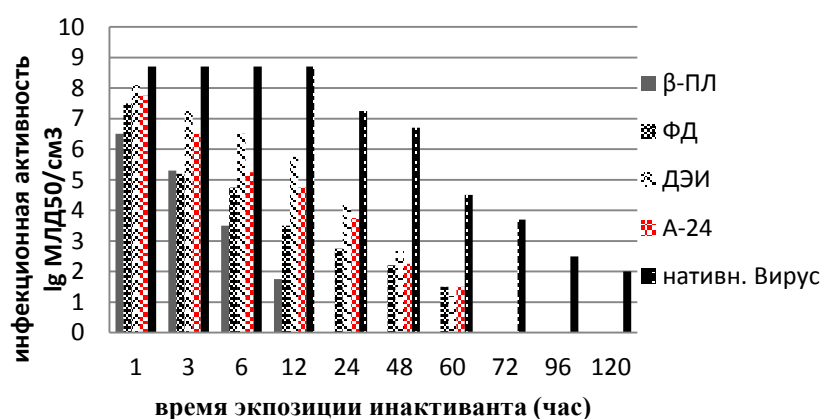
4.3.1.4. Устойчивость вируса лихорадки долины Рифт к действию инактивантов

Важным условием получения эффективных инаktivированных вакцин является подбор инактиванта и оптимальных условий инаktivации, с учетом структуры и свойств возбудителя, обеспечивающих необратимо полную потерю инфекционной активности вируса при максимальном сохранении его антигенности. Учитывая опыт отечественных и зарубежных исследователей в области разработок инаktivированных вакцин против вирусных и бактериальных инфекций, нами изучено воздействие: формалина, β -пропиолактона, димераэтиленimina (ДЭИ) и теотропина (А-24) на инфекционную и антигенную активность вируса лихорадки долины Рифт.

Работу по подбору инактиванта и оптимальных режимов инаktivации проводили с осветленной вируссодержащей культуральной жидкостью с инфекционной активностью не ниже $8,0 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{см}^3$, концентрацией белка не выше $0,5 \text{ мг}/\text{см}^3$. Действие химических препаратов - 1,8,3,6-диэндометилена-1,3,6,8-тетразаиклодекана-теотропина (А-24), формалина, димераэтиленimina и β -пропиолактона на вирус аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» изучали в следующих концентрациях: 0,2%; 0,1%; 0,01%; 0,005% при температурах 18-22°C и 37°C в течение 24-96 часов при периодическом перемешивании. Коррекцию pH в пределах 7,2-7,4 после внесения ДЭИ и А-24 проводили с помощью 20% раствора двухзамещенного фосфорнокислого калия. Для изучения кинетики инаktivации проводили отбор проб через 1, 3, 6, 12, 24, 48, 60, 72, 96 и 120 часов экспозиции с инактивантом. На основании определения константы

скорости инаktivации вируса ЛДР рассчитывали время полной потери инфекционности, которое впоследствии проверяли экспериментально в течение 3 последовательных пассажей на гомологичной культуре клеток и 1-3 суточных белых мышах. Результаты воздействия различных инактивантов на инфекционную активность вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» представлены на рисунке 22.

А. Динамика снижения инфекционной активности вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» при воздействии различных инактивантов в конечной концентрации 0,1% при температуре 37°C.



В. Динамика снижения инфекционной активности вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» при воздействии различных концентраций теотропина

n=3

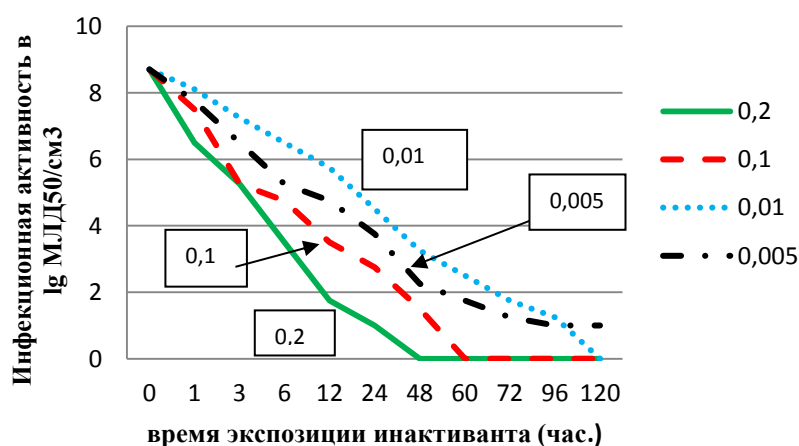


Рис. 22– Динамика процесса инаktivации инфекционной активности вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ». А – различными инаktivантами при 37°C; В. – различными концентрациями теотропина (А-24) при температуре 18-22°C.

Результаты проведенных экспериментов, представленные на рисунке 22 А, свидетельствуют, что через 3 часа инкубации при 37°C в конечной концентрации инаktivантов 0,1% происходит резкое снижение инфекционности вируса - на 4,7 lg MICLD_{50/см3}. Через 24 часа после экспозиции с β-пропиолактоном; через 72 часа инаktivации ФД, ДЭИ и А-24 активный вирус в отобранных пробах обнаружить не удалось. Также отмечено снижение инфекционной активности нативного вируса до 2,0-2,5 lg MICLD_{50/см3} к 96 часам инкубации при 37°C.

Учитывая данные литературы, что инаktivация при более низких температурах, чем 37°C способствует лучшему сохранению антигенных свойств вируса, динамику инаktivации его инфекционной активности изучали при температуре 18-22°C. При воздействии ДЭИ и А-24 отмечено постепенное, приблизительно одинаковое снижение инфекционности. Константа скорости инаktivации вируса ДЭИ при концентрации 0,1% составила 0,62ч⁻¹; А-24 – при концентрации 0,05% составила 0,62ч⁻¹, при 0,1% – 0,86 ч⁻¹.

Гемагглютинирующую и остаточную инфекционную активности вируса после экспозиции с инаktivантами определяли в РНГА и методом параллельного титрования на мышах 1-3 дневного возраста и в культуре клеток, соответственно. Результаты опытов показали прямую зависимость инаktivировующего воздействия теотропина (А-24) на вирус ЛДР от его концентрации и времени экспозиции. При концентрации 0,2% уже через 48 часов выделить активный вирус не удавалось; снижение концентрации до 0,1% обеспечивало инаktivацию вируса через 60 часов; при концентрации инаktivанта 0,01% время инаktivации увеличилось до 120 часов; концентрация 0,005% не обеспечивала инаktivацию вируса. Хотя в первые 60-96 часов титр вируса снижался до 2,0-1,5 lg MICLD_{50/см3} в последующем

закономерно удавалось реизолировать вирус на 2 пассаже даже при экспозиции с инактивантом в течение 120-144 часов. Следует отметить, что воздействие на вирус ЛДР формалином или бета-пропиолактоном в конечной концентрации 0,2% вело к снижению его гемагглютинирующей активности. Препараты, инаktivированные ДЭИ и А-24, при следующем режиме инаktivации: конечная концентрация ДЭИ и А-24 – 0,1%, время экспозиции 72-96 часов при температуре 18-22°C, сохраняли свою гемагглютинирующую активность практически без изменений.

В связи с тем, что полная инаktivация оставшегося вируса, инфекционная активность которого ниже $1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, не всегда может быть обнаружена при титровании в результате случайного отбора проб, особенно при работе с большими объемами вирусного материала, время экспозиции вирусного материала с инаktivантами увеличили до 4 суток.

Окончательный выбор инаktivанта был сделан после проведения опытов по изучению действия перечисленных инаktivантов на антигенную активность вируса. Гемагглютинирующую активность вируса после экспозиции с инаktivантами определяли РНГА. Для оценки антигенной и иммуногенной активности инаktivированного вируса использовали белых мышей массой 18-20 г., которым вводили препараты нативного вируса (группа 1) и инаktivированного А-24 (группа 2). На 28-30 сутки после инокуляции отбирали пробы крови для определения вирусспецифических, антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных животных. При сравнении показателей уровня антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител достоверного различия обнаружено не было. В обеих группах титр вируснейтрализующих антител находился в пределах 1:32-1:64, антигемагглютинирующих составлял – 1:256-1:512, титр вирусспецифических антител в ТФ ИФА – 1:512-1:1024.

Таким образом, в результате проведенных исследований был подобран инаktivант и оптимальный режим инаktivации вируса ЛДР штамм

«1974-ВНИИВУВиМ», позволяющий получать инаktivированное вирусное сырье с максимальным сохранением антигенной и иммуногенной активности.

4.3.1.5. Разработка лабораторных методов контроля вирусного сырья и инаktivированного антигена вируса лихорадки долины Рифт

4.3.1.5.1. Подбор лабораторной модели для контроля безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инаktivированного антигена вируса лихорадки долины Рифт

Для обеспечения безопасности применения инаktivированных вакцин на полноту инаktivации вируса предложено исследовать инаktivированную суспензию, а также готовый препарат [МЭБ, 2009-2012]. Этот факт крайне важен, когда приходится иметь дело с особо опасными арбовирусными зооантропонозами. Разработка наиболее чувствительных и совершенных методов обнаружения минимальных количеств «живого» вируса в инаktivированных препаратах имеет решающее значение для контроля при изготовлении инаktivированных вакцин.

Проведенные исследования, представленные в разделе 4.3.1.1.1 и 4.3.1.1.2, показали, что наиболее чувствительными к вирусу ЛДР являются мыши 1-3 дневного возраста и культуры клеток ВНК-21/13, ПС, что позволило использовать их в качестве модели для определения полноты инаktivации вируса. Каждый из двух использованных методов является в равной степени обоснованным и дополняющим друг друга.

Индикацию активного вируса в осветленной инаktivированной культуральной жидкости определяли параллельно в культуре клеток (по общепринятой методике) и на белых мышах 1-3 суточного возраста путем внутримозгового введения препарата в разведении 10^{-1} на забуференном физиологическом растворе pH 7,2-7,4. За зараженными животными наблюдали в течение 7-10 суток (1 пассаж) и 3 суток (2-5 пассаж). Для надежного доказательства полноты инаktivации вируса проводили 5 последовательных пассажей инаktivированного препарата в чувствительной

культуре клеток и на мышах. Пробы для определения полноты инактивации отбирали через 24 часа после добавления инактиванта и в конце процесса инактивации (3/4 времени инактивации). Препараты, в которых была инактивирована инфекционная активность, вирус не удавалось выявить в течение 3-5 последовательных пассажей. Препарат не вызывал гибели мышей или развития специфического ЦПД в гомологичной культуре клеток. В случае неполной инактивации вирус выделяли на первом-втором пассажах, как в культуре клеток, так и на мышах.

По результатам полученных исследований был сделан вывод, что в случае неполной инактивации вируса, его можно реизолировать в процессе трех последовательных пассажей. Поэтому с целью индикации активного вируса в препаратах (контроль полноты инактивации вируса) проводили три последовательных пассажа в гомологичной культуре клеток и на мышах 1-3 дневного возраста при интрацеребральном заражении.

Таким образом, использование в процессе инактивации осветленной вирусосодержащей суспензии с концентрацией белка не выше $0,5 \text{ мг/см}^3$, контроля полноты инактивации в течение трех последовательных пассажей на мышах 1-3 дневного возраста и в гомологичной культуре клеток гарантировало высокую степень безопасности изготавливаемого инактивированного антигена вируса ЛДР.

Подбор лабораторной модели для оценки безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт

Проведены исследования по подбору лабораторной модели для предварительной оценки безвредности, иммуногенности и антигенной активности препаратов инактивированного антигена вируса ЛДР ввиду того, что изучение этих свойств препаратов на сельскохозяйственных животных сопряжено с чрезвычайной опасностью заражения и является дорогостоящей процедурой.

Одновременные сравнительные испытания способности образцов инактивированного теотропином (А-24) антигена вируса ЛДР из аттенуированного штамма «1974-ВНИИВУВиМ» индуцировать гуморальный иммунный ответ и обеспечить устойчивость животных к вирулентному штамму вируса проводили на белых мышах массой 20-25 г и овцах массой 35-40 кг, которым вводили препараты инактивированного антигена подкожно двукратно с интервалом 14 дней в дозе, соответственно, 0,5 и 2 см³. Гуморальный и протективный иммунный ответопределяли по уровню накопления специфических антител к вирусу ЛДР и устойчивости привитых животных против контрольного заражения вирулентным вирусом ЛДР в дозе 1000 ЛД_{50/см³} через 21-28 дней после введения препарата. За животными вели наблюдение в течение 10-14 дней. Результаты испытания антигенности и иммуногенности препаратов на мышах и овцах представлены в таблице 29.

Таблица 29

Антигенность и иммуногенность препаратов инактивированного антигена вируса ЛДР на мышах и овцах

Активность препарата в РНГА (ГАЕ/см ³)	Вид животных	Антигенная активность препарата(log ₂) (n=3)			Устойчивость животных к контрольному заражению (n=3)		
		РЗНГА	ТФ ИФА	РН	Выжило	Пало	% защиты
256	мыши	7,3±0,5	10,2±0,24	4,8±0,4	18	2	90±0,5
	овцы	8,4±0,27	10,8±0,15	5,6±0,1	4	0	100
128	мыши	6,7±0,14	9,7±0,32	4,2±0,18	17	3	85±0,7
	овцы	7,8±0,3	10,2±0,5	5,2±0,24	4	0	100

Примечание: *в таблице даны величины, обратные разведению сыворотки.

В результате проведенных исследований установлена прямая корреляция титров специфических антител, в том числе ВН у мышей и овец с устойчивостью последних против заражения вирулентным штаммом (коэффициент корреляции 0,87 при $r < 0,05$). Наличие ВН антител в пределах 1:16 и выше обеспечивало 85-90% защиту иммунизированных мышей от вирулентного вируса. При 100% гибели контрольных животных. Двукратная

иммунизация инаktivированным антигеном вируса ЛДР с интервалом 14 дней обеспечивала максимальное накопление специфических антител и устойчивость привитых животных против заражения вирулентным вирусом к 28-30 суткам после иммунизации.

Таким образом, способ оценки иммуногенности на лабораторной модели (аутбредные белые мыши, имеющие массу 18-25 г) по уровню накопления специфических антител, в том числе ВН, в сыворотке крови животных и их устойчивости к контрольному заражению показал себя как достоверный, безопасный и эффективный метод предварительной оценки превентивных свойств вакцины. Препараты, имеющие 80-90% защиту иммунизированных мышей с уровнем вируснейтрализующих антител 1:16-32, антиагглютинирующих – 1:64-128 обеспечивали формирование напряженного протективного иммунитета у 100% привитых овец, начиная с 21-28 суток.

К тому же, виду доступности, относительной безопасности и существенного снижения затрат на проведение исследований оценки антигенной и иммуногенной активности изготовленных инаktivированных препаратов с использованием лабораторной модели позволяет проводить контроль препарата на любой стадии производства вакцины.

4.3.1.5.2. Разработка тест-систем для контроля накопления протективных антигенов вируса лихорадки долины Рифт

Значительную роль в иммуногенности изготавливаемого вакцинного препарата играет антигенная активность вируса. Для предварительного контроля активности вирусных препаратов в процессе их изготовления помимо определения инфекционной активности нами было принято решение изучить взаимосвязь антигенности и иммуногенности препарата с накоплением гликопротеинов в вирусном сырье. Этот критерий антигенности нами выбран в связи с тем, что гликопротеины вируса ЛДР являются основными индукторами синтеза антител, обладающих

вируснейтрализующими свойствами, обеспечивая в дальнейшем протективные свойства препарата [123; 298].

Разработка реакции непрямой гемагглютинации на основе моноклональных антител для выявления антигенов вируса лихорадки долины Рифт

Основной задачей исследований данного раздела являлась разработка на основе моноклональных антител специфичных к нуклеопротеину вируса ЛДР, полученных во ВНИИВВиМ [27] и гликопротеину Gp вируса ЛДР модификаций серологических реакций, позволяющих выявлять антигены иммунодоминантных белков в пробах вирусного материала, и готового препарата инаktivированного антигена вируса ЛДР.

Сущность реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) заключается в том, что эритроциты, на которых предварительно адсорбированы антитела (антиген), приобретают способность агглютинироваться в присутствии вирусспецифических антигенов (антител). При этом комплекс антиген+антитело регистрируется визуально по характеру сформированного осадка.

Для приготовления эритроцитарного диагностикума использовали эритроциты барана, обработанные по общепринятой методике формалином и раствором танина в разведении 1:2000, для фиксации и увеличения адсорбционной емкости эритроцитов. Перед применением обработанные эритроциты тестировали на гомогенность и спонтанную агглютинацию [Бобылов, 2009]. Результаты показали, что полученная взвесь эритроцитов гомогенна, так как эритроциты располагались изолированно: в 10 полях зрения выявлено 3 скопления, содержащие менее 10 эритроцитов. Эритроциты не обладали спонтанной агглютинацией так как их 0,3% взвесь выпадала в осадок в виде пуговки в течение 1,5-2 часов.

Специфическую активность МКА к гликопротеину Gp вируса ЛДР клонов 4В4 и 5С12 определяли в непрямом ТФ ИФА на основе САА. Препараты очищенных Ig МКА считали кондиционными, если они имели концентрацию по белку 1,0 мг/см³ и титр с САА 1:100 тыс.

Для определения оптимальной сенсibiliзирующей дозы иммуноглобулинов МКА (Ig МКА) 5% взвесь отмытых формализированных, танизированных эритроцитов разливали по 4 см³ в 4 пробирки. Ig МКА разводили ЗФР pH6,4 до конечной концентрации по белку 10; 20; 40; 80 мкг/см³ и добавляли по 4 см³ в пробирки с суспензией эритроцитов. Инкубировали 1 час при 45°C и добавляли глутаровый альдегид до конечной концентрации 0,4%. Инкубировали 0,5 часа при 45°C; 4-кратно отмывали ЗФР pH7,2 центрифугированием при 1100g в течение 10 мин. Активность полученных сенсibiliзированных эритроцитов определяли в РНГА с САА и культуральным антигеном вируса ЛДР. Оптимальной сенсibiliзирующей дозой Ig МКА считали концентрацию по белку, обеспечивающую наивысшую чувствительность со специфическим антигеном и не выявляющую антигены гетерологичных вирусов (Найроби, Арумовот, ГП). В наших опытах оптимальная доза сенсibiliзации эритроцитов составила 20 мкг/см³. Для приготовления партии диагностикума к 5% взвеси обработанных эритроцитов добавляли равный объем Ig МКА, содержащий 1,5 оптимальные дозы сенсibiliзации.

Применение РНГА и ДАС-ИФА для обнаружения гликопротеина вируса лихорадки долины Рифт

Концентрация структурных иммунодоминантных белков в вирусном сырье и готовом препарате инаktivированных вакцин определяет синтез в организме привитых животных специфических антител и развитие активного иммунитета, в том числе протективного.

Поэтому нами была изучена специфичность и чувствительность РНГА с использованием полученного эритроцитарного диагностикума и ДАС-ИФА на основе МКА к нуклеокапсиду и гликопротеину G_n вируса ЛДР для определения накопления соответствующих протективных белков в культуральной жидкости при наработке вирусосодержащего материала для изготовления инаktivированного антигена вируса ЛДР. Для этого отбирали (по три пробы) культуральную жидкость каждые 24 часа культивирования. Отобранные пробы вирусосодержащего материала исследовали сразу или

хранили при температуре минус 70°C до использования. Пробы титровали в трехкратной повторности параллельно в ДАС ИФА и РНГА в соответствии с общепринятыми методиками. Кроме того ставили контроль специфичности с заведомо положительными и заведомо отрицательными антигенами. Результаты проведенных испытаний сравнительного изучения чувствительности РНГА на основе сенсibilизированных эритроцитов и ДАС ИФА на основе МКА представлены в таблице 30.

Таблица 30

Динамика накопления антигенов структурных белков вируса ЛДР в процессе его культивирования в культуре клеток ВНК-21/13

Отбор проб (сутки)	Метод контроля	Активность отобранных проб культуральной жидкости ($\log_2$) (n=3)			
		Проба №1	Проба №2	Проба №3	Проба №4*
1	ДАС ИФА _{NP}	8,9±0,2	7,5±0,4	8,6±0,3	1,2±0,3
	ДАС ИФА	6,7±0,1	5,8±0,4	6,4±0,6	1,4±0,1
	РНГА _{GN}	4,5±0,2	3,4±0,1	5,6±0,1	0
2	ДАС ИФА _{NP}	10,5±0,4	9,3±0,2	9,8±0,3	1,0±0,4
	ДАС ИФА	9,8±0,3	8,7±0,5	10,0±0,4	1,1±0,6
	РНГА _{GN}	6,7±0,4	6,2±0,1	7,8±0,3	0
3	ДАС ИФА _{NP}	11,8±0,2	11,9±0,4	11,6±0,7	1,0±0,2
	ДАС ИФА	11,7±0,3	11,0±0,2	11,5±0,1	1,4±0,3
	РНГА _{GN}	9,2±0,2	8,6±0,3	9,4±0,2	0
4	ДАС ИФА _{NP}	11,7±0,5	11,6±0,1	11,5±0,3	1,3±0,5
	ДАС ИФА	11,5±0,6	10,9±0,4	11,25±0,5	1,2±0,7
	РНГА _{GN}	8,9±0,2	7,5±0,5	9,1±0,4	0

Результаты, представленные в таблице 30, показывают, что накопление гликопротеина G_n и нуклеопротеина вируса ЛДР в процессе культивирования происходило постепенно в период 48-60 часов культивирования; достигало максимума к 72 часам и удерживалось практически на этом уровне еще сутки (срок наблюдения).

При исследовании данными методами проб интактной культуры (Проба № 4) или зараженной гетерологичными вирусами (Арумовот,

Найроби, ГП) положительных реакций отмечено не было. Величина оптической плотности субстратного раствора в лунках с гетерологичными пробами в ДАС-ИФА также не превышала уровня фона ОП₄₀₅ - 0,053-0,15.

Результаты проведенных исследований показали, что разработанная РНГА с использованием эритроцитарного диагностикума на основе МКА к гликопротеину Gp вируса ЛДР высоко специфична и имеет ряд преимуществ по сравнению с РГА. По чувствительности РНГА уступала ТФ ИФА в 4-8 раз, однако позволяла при предварительной оценке качества вирусного сырья получать результаты в более короткие сроки (1-2 часа), проще в исполнении, не требует специального оснащения лаборатории.

Таким образом, разработанные и РНГА на основе МКА к гликопротеину, и ДАС-ИФА на основе МКА нуклеопротеину вируса ЛДР могут быть использованы для технологического контроля процесса накопления антигенов структурных иммунодоминантных белков вируса при наработке вирусного сырья для изготовления вакцин против ЛДР.

Изучение корреляции иммуногенности и гемагглютинирующей активности инаktivированных препаратов

Нами проведено изучение корреляции гемагглютинирующей активности и иммуногенности инаktivированных препаратов,изготовленных из аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ», культивируемого в клетках линии ВНК-21, инаktivированного теотропином (0,1%) имеющих исходную гемагглютинирующую активность в РНГА - 64-128 ГАЕ/см³ и изучены их иммуногенные свойства; определение концентрации гемагглютинина, гарантирующей 50% защиту животных от контрольного заражения вирулентным вирусом.

С этой целью белым мышам массой 18-20 г вводили дважды подкожно с интервалом 14 дней приготовленные двукратные разведения инаktivированных препаратов. Каждой дозой ГА иммунизировали 10 мышей одного пола. Через 28 дней после иммунизации у животных отбирали кровь, сыворотку которой исследовали на наличие специфических антител в РЗНГА, РН и непрямом ТФ ИФА на основе МКА к гемагглютину

Гнвируса ЛДР и заражали вирулентным штаммом «Энтеббе» в дозе 10^3 МЛД_{50/см³}. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 31.

Таблица 31

Антигенные и иммуногенные свойства инаktivированных препаратов вируса ЛДР в зависимости от концентрации гемагглютенина

Активность Препарата в РНГА	Концентрация ГАЕ/метод испытания	Иммунореактивность вводимых препаратов для белых мышей* (n=3)				
		128	64	32	16	8
128ГАЕ/см ³	РЗНГА	7,24±0,31	6,5±0,7	5,74±0,25	4,78±0,81	3,4±0,73
	РН	4,89±0,05	3,7±0,014	3,4±0,043	2,58±0,016	0
	ТФ ИФА	5,89±0,30*	3,25±0,5	3,5±0,29	2,67±0,6	1,07±0,4
	% защиты после контр.заражения	75±0,5	55±0,8	42±0,2	34±0,8	22±0,3
256ГАЕ/см ³	РЗНГА	8,2±0,61	6,97±0,1	6,34±0,1	5,36±0,32	4,29±0,17
	РН	4,9±0,35	3,89±0,4	3,59±0,54	3,1±0,4	0
	ТФ ИФА	7,1±0,27	3,5±0,6	3,68±0,24	2,2±0,47	1,85±0,24
	% защиты после контр.заражения	77±0,4	63±0,2	45±0,02	25±0,8	20±0,2

Примечание.*- в таблице представлены результаты серологических реакций ($\log_2$); начальное разведение сыворотки для ТФ ИФА – 1:50.

Результаты проведенных исследований, представленные в таблице 31, показывают, что препараты, имеющие исходную активность в РНГА 64 ГАЕ/см³ и выше, стимулировали к 28 суткам после иммунизации образование антигемагглютининов в пределах 1:64-128, вируснейтрализующих 1:8-16, вирусспецифических – 1:200-1:400 и обеспечивали 50-60% защиту животных от гибели после заражения вирулентным штаммом. Коэффициент корреляции гемагглютинирующей активности, антигенности и иммуногенности инаktivированных препаратов составил 0,9 и 0,87, соответственно, определяя что, существует прямая зависимость между концентрацией в препарате гликопротеинов и его иммуногенной активностью. Также отмечено, что сыворотки, имеющие в РН титр антител ниже 1:16 в нТФ ИФА на основе МКА к нуклеопротеину оказались отрицательными.

На основании полученных данных был сделан вывод, что в качестве критерия оптимальной антигенности и иммуногенности препарата может

служить условная единица, содержащая в 1см^3 64 ГАЕ (минимальная иммунизирующая доза), обеспечивающая 50% защиту от заражения вирулентным вирусом. Результаты исследований показали, что тест определения ГАЕ является простым и надежным лабораторным методом для предварительной оценки антигенности вирусного сырья и в перспективе изготовления эффективной инактивированной вакцины против ЛДР.

Методы повышения антигенности и иммуногенности инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт

Приведенные в предыдущих разделах данные показали, что инактивированный антиген вируса ЛДР обладает определенной антигенностью и иммуногенностью. Обеспечивая в среднем не более 70% защиты иммунизированных животных от контрольного заражения. Согласно требованиям МЭБ, ВОЗ [614; 617; 618] инактивированная вакцина должна обеспечивать не менее 80% устойчивость животных против заражения вирулентным вирусом.

Известным методом, повышающим иммуногенность инактивированной вакцины, является одновременное введение специфического антигена и адъюванта. Нами на лабораторной модели изучено иммуностимулирующее воздействие наиболее распространенных адъювантов: гидроокиси алюминия (дисперсность 2-10 мкр -80%), масляного адъюванта, состоящего из 75% вакцинного масла ТУ 38101-307-72, 25% ланолина Р 64.228.131и полного адъюванта Фрейнда.

Испытанию на животных подвергали препараты инактивированного антигена вируса ЛДР, изготовленные из культурального вирусосодержащего материала штамма «1974-ВНИИВВиМ» с титром инфекционной активности не менее $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, инактивированного А-24 0,1%, имеющие титр гемагглютинирующей активности 64 ГАЕ/ см^3 и выше. Полученный культуральный инактивированный антиген вируса ЛДР сорбировали на ГОА путем добавления к инактивированному вирусному сырью пропущенный через коллоидную мельницу 6% раствор ГОА до конечной концентрации сухого остатка 6 мг/ см^3 (0,6 %), тщательно перемешивали в течение 30-45

мин. и оставляли при температуре 2-6°C на 24 часа для осаждения «нагруженного» антигеном гидроксала.

Инактивированную вирусную суспензию смешивали с масляным адъювантом (полным адъювантом Фрейнда) в соотношении 1:1. Смесь эмульгировали на гомогенизаторе НГД-3,0. Качество эмульсии оценивали по сохранению капли в воде и устойчивости при центрифугировании при 2000 об/мин. в течение 30 минут.

Иммуностимулирующее воздействие адъювантов оценивали по разнице индукции гуморального иммунитета и степени защиты животных от контрольного заражения через 14 суток после второй иммунизации исследуемыми препаратами инактивированного антигена, введенными с различными адъювантами и без них. Результаты сравнительного изучения иммуностимулирующего воздействия изучаемых адъювантов представлены в таблице 32.

Таблица 32

Иммуностимулирующее действие адъювантов

Характеристика препарата	адъювант	Свойства препарата	
		Антигенные	Иммуногенные
		РЗНГА/РН (n=3)	% защиты (n=3)
64 ГАЕ /см ³	без адъюванта	6,58±0,4/3,48±0,2	75±0,38
	гидроксал	8,23±0,34/5,46±0,25	95±0,43
	масляный	7,98±0,47/4,24±0,18	97±0,25
	полный адъювант Фрейнда	9,1±0,14/5,12±0,61	93±0,34

Результаты, представленные в таблице 32, показали, что препараты инактивированного антигена вируса ЛДР введенные мышам с адъювантами способствует повышению индукции синтеза специфических антител и степени защиты. Так титры специфических антител в сыворотке крови мышей, которым вводили препараты с масляным адъювантом и сорбированных на ГОА группах превышали таковые препаратов без адъюванта в 4-6 раз. Процент защиты против заражения вирулентным вирусом в этих группах в среднем составлял более 90%.

Иммуностимулирующие свойствами полного адьюванта Фрейнда, обеспечивали увеличение титра специфических АТ в 8-10 раз. Однако для дальнейших исследований предпочтение отдано ГОА, так как при его применении в данном случае происходит также одновременное концентрирование антигена.

4.3.2. Разработка оптимальных стратегий вакцинации против гриппа птиц пятого подтипа и лихорадки долины Рифт

Успешное сдерживание и купирование очагов инфекции с помощью вакцинации возможно в случае, если используемые препараты вакцин вызывают формирование иммунного ответа у привитых животных в первые 1-3 дня после введения. Стратегия прайм-бустерной иммунизации - повторное введение вакцины с целью повышения (усиления) поствакцинального иммунитета формирует основу традиционной вакцинацинологии и широко используется на практике.

Задачей данного раздела являлось в рамках разработки эффективной стратегии борьбы с экзотическими и карантинными особо опасными инфекциями изучение потенциала прайм-бустерной иммунизации на примере гриппа птиц подтипа H5 и лихорадки долины Рифт. Для этого нами изучен иммунный ответ, индуцируемый различными вариантами прайм-бустерной иммунизации.

4.3.2.1. Эффективность гомологичной прайм-бустерной иммунизации на основе инаktivированного антигена вируса лихорадки долины Рифт

Для проведения исследований разработки стратегии вакцинации против ЛДР изготовлено 5 образцов инаktivированного антигена вируса ЛДР аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ», имеющих активность в РНГА не менее 256 ГАЕ/см³, прошедших контроль на: стерильность; полноту инаktivации вируса, безвредность, реактогенность, антигенную и иммуногенную активность с использованием аутбредных белых мышей различных возрастов. Эффективность экспериментальных препаратов инаktivированного антигена оценивали по уровню накопления

специфических антител, в том числе ВН и устойчивости привитых животных против летальной дозы вирулентного вируса ЛДР.

Результаты исследования показали, что образцы препаратов ГОА-сорбированного инаktivированного антигена не содержали активного вируса ЛДР, так как при внутримозговом введении не вызывали в течение 10 суток (срок наблюдения) гибели мышей 1-3 суточного возраста. Ареактогенны и безвредны - при подкожном введении препаратов мышам массой 18-20 г и морским свинкам массой 350-400 г по 1,0 и 2 см³, соответственно, не вызывали гибели животных, проявления каких-либо признаков ЛДР и отклонений от физиологической нормы в течение срока наблюдения (14 суток). На месте введения появлялась ограниченная припухлость, которая сохранялась в течение 3-4 суток.

Изучение на белых мышах зависимости антигенности и иммуногенности от кратности введения препарата показало, что однократная иммунизация предохраняет лишь 40-50% иммунизированных животных от летальной дозы вирулентного вируса. Уровень специфических антител у 40% привитых животных к 10-14 суткам составлял антигемагглютинирующих (антиГА) 1:8-32, вируснейтрализующих – 1:8. Препараты инаktivированного антигена при двукратном введении с интервалом 14 суток обеспечивали устойчивость 80-90% иммунизированных мышей. Титр антиГА и ВН антител в сыворотке крови мышей через 14 дней после второй иммунизации увеличился в 4-8 раз и составил 1:128-1:512 и 1:16-1:32, соответственно. Трехкратное введение препарата с интервалом 10 дней обеспечило 90-100% устойчивость мышей против заражения 1000 ЛД₅₀ вирулентного вируса, синтез специфических антител в пределах: антиГА – 1:256-1:512; ВН - 1:64-1:128. Учитывая полученные результаты, что двукратное введение инаktivированного антигена с интервалом 14 дней, как и трехкратное, предохраняет более 80% мышей от гибели при контрольном заражении вирулентным вирусом и индуцирует синтез защитного уровня ВН антител,

пришли к выводу, что двукратное введение препарата ГОА-сорбированного инактивированного антигена является оптимальным.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что препараты ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР безвредны, ареактогенны; не содержат активный вирус; двукратное его введение индуцировало у привитых белых мышей синтез защитного уровня вируснейтрализующих антител, в пределах 1:32-1:64. Привитые животные были устойчивы против контрольного заражения вирулентным вирусом штамм «Энтеббе» в дозе 1000 ЛД.

Изучение динамики накопления специфических антител в сыворотке крови привитых животных, сроков наступления, длительности иммунитета проводили с использованием 4 лабораторных образцов препаратов инактивированного антигена, имеющих следующие характеристики: исходный титр инфекционной активности в культуре клеток ВНК-21/13 - 8,5-8,9 lgMICLD_{50/см3}; инактивирован А-24 (0,1%), сорбирован на ГОА, антигенная активность в РНГА - 128-256 ГАЕ/ см³, в ТФ ИФА – 2048-4096. Пробы крови у привитых мышей отбирали через 7; 14; 28, 35; 42 и 60 суток после первого введения образцов антигена. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 33.

Таблица 33

Динамика развития гуморального и протективного иммунитета у мышей, иммунизированных препаратом инактивированного антигена вируса ЛДР

Время отбора проб и контрольного заражения	Антигенность препаратов (log ₂) (n=3)			Устойчивость к контрольному заражению (n=3)
	РН	РЗНГА	ТФ ИФА _{GN} *	%
М-д контроля	0	0	0	н/и
До иммунизации	0	0	0	н/и
7	1,8±0,5	2,72±0,17	3,6±0,43	12±0,3
14	2,8±0,16	4,07±0,5	5,4±0,27	53±0,5
28	4,98±0,23	7,45±0,35	6,25±0,54	82±0,4
35	5,08±0,37	8,1±0,24	6,96±0,61	95±0,3
60	4,75±0,62	7,92±0,28	6,49±0,22	89±0,2

Примечание: * - ТФ ИФА_{GN} на основе МКА к гликопротеину GN, начальное разведение сыворотки крови мышей 1:50.

Результаты исследований, представленные в таблице 33, показывают, что в сыворотке крови животных уже через 10-14 суток после введения препарата можно обнаружить специфические антитела, уровень выявления которых составлял: в ВН -1:8-1:16; РНГА – 1:16-1:32; в нТФ ИФА_{GN} – 800-1:1600. На 28-35 сутки после первого введения инактивированного антигена титры антител достигали максимального уровня и удерживались примерно на том же уровне до 60 суток (время наблюдения). Из данных, представленных в таблице 33 очевидно, что параллельно с нарастанием титра специфических антител в крови вакцинированных животных увеличивался процент их устойчивости к контрольному заражению. Результаты контрольного заражения показали, что через 14 суток после первого введения препарата более 50% привитых мышей, а к 28-30 суткам более 90% иммунизированных мышей оказались устойчивыми против интраперитонеального заражения летальной дозой штамма «Энтеббе» при 90-95% гибели контрольных не привитых животных.

Для изучения способности цельновирионного инактивированного антигена вируса ЛДР индуцировать иммунный ответ, препятствующий размножению вирулентного вируса, у привитых мышей через 3 и 5 суток после контрольного заражения отбирали пробы крови и определяли уровень виремии биопробой на мышках 1-3 суточного возраста при интрацеребральном заражении. В результате проведенных исследований выделить активный вирус в пробах крови животных не удалось. В то время как у контрольных не вакцинированных животных уровень виремии в этот период составлял 5,5-6,25 lg MICLD_{50/см3}. Гибель контрольных животных наступала на 3-5 сутки после заражения.

Таким образом, разработанная методика получения инактивированного антигена вируса ЛДР, обладающего антигенными и иммуногенными свойствами, отвечающими предъявляемым требованиям может быть рекомендована для применения в перспективе разработки эффективной безопасной инактивированной вакцины против ЛДР для профилактики

распространения болезни среди поголовья восприимчивых животных в угрожаемых и неблагополучных по ЛДР зонах.

4.3.2.2. Эффективность гомологичной прайм-бустерной ДНК-иммунизации против гриппа птиц пятого подтипа

Как показали результаты первой серии опытов, представленные в разделе 4.1, рекомбинантные плазмиды, несущие вставку генов гликопротеинов вируса ЛДР, при однократном внутримышечном введении белым мышам линии BALB/c в первые сутки после введения индуцировали у привитых животных синтез специфических антител к целевому белку (рисунок 3, 4, 5; таблица 5); обеспечивали активацию и дифференциацию Т- и В-лимфоцитов и стимулировали развитие преимущественно иммунного ответа Th1 типа.

Одной из задач наших исследований являлось изучение способности рекомбинантных ДНК, кодирующих поверхностные гликопротеины вируса, индуцировать развитие раннего иммунного ответа, в том числе протективного, способного защищать привитых животных от контрольного заражения вирулентным вирусом.

Эффективность применения ДНК-иммунизации для индукции раннего иммунитета в том числе протективного показана на примере модельных систем, включающих конструкции: pInfNP, pInfHA5, кодирующие, соответственно, полноразмерный ген нуклеопротеина вируса гриппа птиц и консервативный участок гемагглютиниона вируса гриппа птиц подтипа H5. Для решения задачи усиления иммуногенной эффективности ДНК-конструкций использовали различные подходы: введение ДНК-конструкций в составе микрочастиц; бустирование гомологичными ДНК-конструкциями. Работу проводили совместно с Беловым С.Ю. с соавторами и сотрудниками (исследовательская группа д.х.н. Е.А. Марквичевой) ИБХ РАН (г. Москва)

Первоначально иммуногенность изучаемых рекомбинантных конструкций оценена на аутбредных белых мышах. При определении оптимальной иммунизирующей дозы рекДНК установлен дозозависимый

эффект - однократное их введение в дозе 5-250 мг/гол. индуцировало синтез специфических антител, выявляемый на 21 сутки в пределах 1:20-1:3200 в нТФ ИФА. Оптимальная иммунизирующая доза рекДНК для белых мышей массой 18-25 г составила 25-30 мг на инъекцию. Для подбора оптимального композитного состава биосовместимых биodeградируемых микрокапсул и изучения способности рекДНК вызывать развитие протективного иммунного ответа белым мышам массой 18-25 г вводили внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра по 25 мкг/гол. рекомбинантные плазмиды pInfNP, pInfHA5 на ЗФР pH 7,2-7,4 и заключенные в микрокапсулы (оптимальный средний размер 2-5 мкм), мембраны которых были образованы на основе пары: хитозан/карагинан [(CH-2(mod)/Car)₃] и декстран/карагинан [(DEAE-dextran/Car)₃]. Пробы крови от привитых животных отбирали через 14 и 21 день после первой иммунизации и исследовали на наличие специфических антител к гемагглютинуину (HA5) и NP в непрямом ТФ ИФА на основе МКА к HA5, NP и соответствующих рекомбинантных белков. Результаты исследований представлены в таблице 34.

Таблица 34

Динамика накопления специфических антител к HA5 и NP в сыворотке крови мышей в результате ДНК-иммунизации

Дни взятие проб крови	Вводимые рекомбинантные ДНК (25 мкг/мышь)					
	pInfHA5			pInfNP		
	Активность сывороточных антител (log ₂) (n=3)					
	нТФ ИФА _{HA5} *			нТФ ИФА _{NP} **		
	(CH- 2(mod)/Car) ₃	(DEAE- dextra/Car) ₃	нативная	(CH- 2(mod)/Car) ₃	(DEAE- dextran/Car) ₃	нативная
14	6,98±0,44 ⁺	6,6±0,34	5,75±0,24	6,2±0,43	5,65±0,6	5,15±0,29
21	8,1±0,65	7,3±0,25	7,1±0,5	7,98±0,31	7,4±0,47	6,75±0,66

Примечание: * и ** - результаты непрямого ТФ ИФА на основе МКА к HA5 и NP, соответственно; «+» - значения log₂, начиная с разведения 1:50.

Результаты исследований, представленные в таблице 34, показали незначительные различия титров антител от 0,5 до 1,0 log₂ при введении нативной и инкапсулированной ДНК, выявляемых через 14 и 21 день после

инокуляции, а также зависимость уровня синтеза антител от вида вводимых микрокапсул. Для дальнейших исследований оценки развития иммунитета при ДНК-иммунизации на целевых животных предпочтение было отдано микрокапсулам состава [(CH-2(mod)/Car)₃], индуцирующих синтез более высоких титров специфических антител.

Для этого формировали 4 группы цыплят 28-суточного возраста, которым вводили внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра дважды с интервалом 14 суток по 50 мкг/цыпл. соответствующие рекомбинантные плазмиды pInfNP, pInfHA5 на ЗФР pH 7,2-7,4 или заключенные в микрокапсулы состава хитозан/карагинан. Сыворотку от каждой группы исследовали в РН со 100 ТЦД_{50/см3} в культуре клеток MDCK со штаммами H5N2; H5N1; H5N3; в нТФ ИФА на основе МКА к NP и HA5 на наличие специфических антител к соответствующим белкам вируса гриппа птиц. Пробы крови отбирали через 5, 7, 14, 21 и 28 дней.

Полученные результаты изучения развития гуморального иммунитета соответствовали таковым, полученным на белых мышах. На 7 сутки после введения рекомбинантных плазмид pInfNP и pInfHA5 в сыворотке крови привитых цыплят выявляли специфические антитела, титр которых превышал фоновое значение нормальной сыворотки в 2 и более раз. Повторное через 14 суток введение рекДНК не привело к значительному увеличению уровня специфических антител. Титр ВН антител в сыворотке крови привитых животных, определяемый в РН с вирусом гриппа птиц пятого подтипа, к 21 суткам после первой иммунизации составил 1:8-1:16; титр нативной сыворотки 1:2.

Для оценки развития клеточного иммунного ответа на ДНК-иммунизацию через 8 и 14 дней после введения инкапсулированной и нативной рекДНК проводили вынужденный убой цыплят, суспензию спленоцитов которых готовили на растворе Хенкса. Определение субпопуляций Т-лимфоцитов с использованием антител к CD маркерным рецепторам лимфоцитов кур и антивидовых типоспецифических антител,

меченых FITC (Secotec) проводили в проточном цитофлуориметре (BDFACS Calibur, Bectronand Dickinson) согласно инструкции производителя. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 35.

Таблица 35

Количественные изменения субпопуляций Т-лимфоцитов селезенки цыплят, привитых рекомбинантными ДНК pInfNP и pInfHA5

Дни взятия проб спленотомов	Количество субпопуляций Т-лимфоцитов							
	Вводимые рекомбинантные ДНК (50 мкг/цыпл.)							
	pInfHA5				pInfNP			
	(CH-2(mod)/Car) ₃		нативная		(CH-2(mod)/Car) ₃		нативная	
	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
8	12,73± 1,07	29,52± 1,34	-	-	20,95± 1,33	35,17± 1,47	-	-
14	12,04± 0,87	34,86± 1,22	25,7± 1,66	28,34± 0,68	22,91± 0,89	34,38± 1,13	14,54± 1,72	29,82± 0,66

Примечание: «-» - отрицательный результат.

Результаты, представленные в таблице 35 свидетельствуют об увеличении % активированных CD4+и CD8+Т-лимфоцитов в группах цыплят, которым вводили инкапсулированную плазмиду по сравнению с нативной. Также очевидно преобладание в первые 8 дней после ДНК-иммунизации клеточного иммунитета Th1 типа, которое сохранялось до 14 суток (срок наблюдения). Иммунорегуляторный индекс находился в пределах нормы ($>1,0 < 3,25$) и составлял от 1,5 до 2,9.

Для исследования протективной и перекрестной активности развивающегося иммунитета в результате ДНК-иммунизации рекомбинантными плазмидами pInfNP и pInfHA5 проводили контрольное заражение привитых и интактных цыплят на 21 сутки после второй иммунизации гомологичным (А/Пенсильвания/83 Н5Н2 и А/Новосибирск/05 Н5Н1) и гетерологичным (А/Росток/29 Н7Н7) по гемагглютиниру подтипом высоковирулентного вируса гриппа птиц в дозе 100 ЛД_{50/цыпл.}. За животными вели клиническое наблюдение в течение 10 суток. Результаты контрольного заражения высоковирулентными вирусами гомологичного и гетерологичного подтипов представлены в таблице 36

Таблица 36

Результаты контрольного заражения цыплят, привитых рекомбинантными ДНК pInfNP и pInfHA5

n=3

Штамм вируса ГП	Вводимые рекомбинантные ДНК (50 мкг/цыпл)				Контрольная группа
	pInfNP + pInfHA5		pInfHA5		
	Выжило/ пало	% защиты	Выжило/ пало	% защиты	Выжило/ пало
А/Новосибирск/05 H5N1	15/5	75	13/7	65	0/10
А/Пенс./83 H5N2	14/6	70	12/8	60	0/10
А/Росток/29 H7N7	4/6	40	2/8	20	0/10

Приведенные в таблице 36 данные показали, что двукратная внутримышечная иммунизация инкапсулированной рекомбинантной плазмидой pInfHA5 отдельно и в сочетании с рекомбинантной плазмидой pInfNP, кодирующей NP, обеспечивала 65-75% уровень защиты от летальной дозы гомологичного штамма H5N1, индукцию перекрестного иммунитета в пределах одного подтипа HA5, но разных субтипов - H5N2 (60-70%), а также гетерологичного по HA подтипа: одновременно введенные рекомбинантные плазмиды pInfHA5 и pInfNP обеспечивали 40% защиту привитых цыплят от гибели при заражении ВПГП седьмого подтипа.

С целью подтверждения развития протективного иммунитета в результате ДНК-иммунизации, способного защитить привитых животных от заражения вирулентным вирусом у цыплят отбирали пробы крови на 5 и 7 день после контрольного заражения для определения уровня антител к нуклеопротеину. Результаты представлены в таблице 37. Представленные в таблице 37 результаты свидетельствуют, что после контрольного заражения вирулентным вирусом отмечено увеличение уровня антител к NP вируса гриппа птиц в группах цыплят, привитых плазмидой pInfNP отдельно и в совокупности с плазмидой pInfHA5. Подобный эффект отсутствовал в группе цыплят, привитых рекомбинантной плазмидой pInfHA5 отдельно. Подобный эффект отсутствовал в группе цыплят, привитых рекомбинантной плазмидой pInfHA5 отдельно.

Таблица 37

Уровень специфических антител в сыворотке крови цыплят, иммунизированных рекомбинантными плазмидами pInfNP и pInfHA5

Вводимые рекДНК (50 мкг/цыпл)/ дни отбора проб		Активность сывороточных антител ($\log_2$) (n=5)						
		нТФ ИФА*		РТГА		РН		нТФ ИФА _{NP} *
рекДНК	сутки	HA5	HA7	H5N2	H7N7	H5N2	H7N7	NP
pInfNP + pInfHA5	до к.з.	7,1±0,15	1,2±0,3	7,75±0,2	-	3,75±0,2	-	7,2±0,16
	5	7,73±0,4	1,1±0,2	8,5±0,14	2,3±0,46	4,14±0,6	-	7,5±0,3
	7	8,34±0,2	1,4±0,2	9,75±0,4	2,1±0,32	4,25±0,6	-	8,1±0,28
pInfNP	до к.з.	1,2±0,27	1,5±0,2	н/и	н/и	-	-	7,4±0,2
	5	1,6±0,32	1,3±0,6	н/и	н/и	-	-	9,22±0,3
	7	1,5±0,25	1,1±0,4	н/и	н/и	-	-	10,13±0,
pInfHA5	до к.з.	6,98±0,2	1,2±0,2	7,4±0,32	2,4±0,62	3,7±0,17	-	-
	5	7,93±0,4	1,4±0,4	8,3±0,46	2,62±0,5	4,24±0,6	-	-
	7	8,52±0,2	1,2±0,3	10,1±0,5	2,5±0,14	4,75±0,46	-	-
Контрольная группа	5	5,87±0,6	1,6±0,1	4,35±0,5	2,6±0,18	1,9±0,27	1,7± 0,28	6,05±0,1

Примечание: н/и – не исследовали; «-» - отрицательный результат; * - нТФ ИФА на основе соответствующего антигена, начальное разведение сыворотки 1:50

Отсутствие факта увеличения уровня антител к NP вируса гриппа птиц в этой группе свидетельствует о том, что в организме привитых цыплят после контрольного заражения не происходит размножение контрольного вирулентного вируса ГП А/Пенсильвания/83 H5N2. Также отмечено нарастание титров антител к гемагглютиниру в группах цыплят, привитых плазмидой pInfHA5 отдельно и в совокупности с pInfNP. Синтезируемые в результате генетической иммунизации специфические антитела взаимодействовали в РТГА, нТФ ИФА и нейтрализовали в РН антигены вируса гриппа птиц гомологичного пятого подтипа разных субтипов, но не вступали в реакцию и не обеспечивали нейтрализацию вируса гетерологичного подтипа H7.

Таким образом, полученные результаты показали, что двукратная внутримышечная гомологичная прайм-бустерная ДНК-иммунизация инкапсулированной рекомбинантной плазмидой pInfHA5 отдельно или в

совокупности с pInfNP индуцировала развитие раннего иммунного ответа обоих звеньев, начиная с 7 суток (срок наблюдения).

4.3.2.3. Эффективность гомологичной прайм-бустерной ДНК-иммунизации против лихорадки долины Рифт

Полученные положительные результаты исследований, освещенных в предыдущих разделах позволили продолжить более детальное изучение формирования иммунного ответа при ДНК-иммунизации на примере использования ДНК-конструкций pCI-neo/Gc3/3 и pCI-neo/Gn/2/2 (50 мкг/мышь), кодирующих гликопротеины вируса ЛДР. Изучение применения различных подходов повышения эффективности ДНК-иммунизации проводили на клинически здоровых аутбредных белых мышах массой 18-25 г. Ведение рекомбинантной ДНК в ассоциации с синтетическим генетическим адъювантом CpG ODN отдельно и в составе биосовместимых биodeградируемых микрочастиц; одной и двух бустерных доз рекомбинантными ДНК при сокращении интервала между инъекциями. Работу проводили совместно с Иматдиновым И.Р. с соавторами и сотрудниками (исследовательская группа д.х.н. Е.А. Марквичевой) ИБХ РАН (г. Москва)

Для проведения исследований сформировано 6 групп в каждой по 20 белых мышей, которых иммунизировали рекомбинантными ДНК, несущими вставку генов, кодирующих гликопротеины Gn/Gc вируса ЛДР: на ЗФР pH 7,2-7,4; в ассоциации с синтетическим генетическим адъювантом CpG-мотивом и без него; заключенными в биосовместимые биodeградируемые микрочастицы. Контроль синтеза специфических антител на синтезированный *in vivo* гибридный белок проводили непрямым ТФ ИФА на основе культурального антигена вируса ЛДР с активностью в ТФ ИФА не менее 1:1600; в РН со 100 ТЦД_{50/см3} вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ». Для каждого интервала времени отбирали пробы крови от трех мышей: на 7, 14, 21, 28-30, 45-50, 70 и 84 сутки; для получения моноклеаров

периферической крови и спленоцитов пробы отбирали на 3, 7, 10 и 21 сутки после первой иммунизации.

Нами изучена динамика накопления специфических антител к гликопротеинам вируса ЛДР в результате 2-кратной с интервалом 14 дней внутримышечной иммунизации белых мышей ДНК-конструкциями pCI-neo/Gc3/3 и pCI-neo/Gn/2/2 (50 мкг/мышь) без адьюванта и совместно с синтетическим модифицированным CpG ОДН. Результаты проведенных исследований развития гуморального иммунитета в результате иммунизации рекомбинантными плазмидами представлены на рисунке 23.

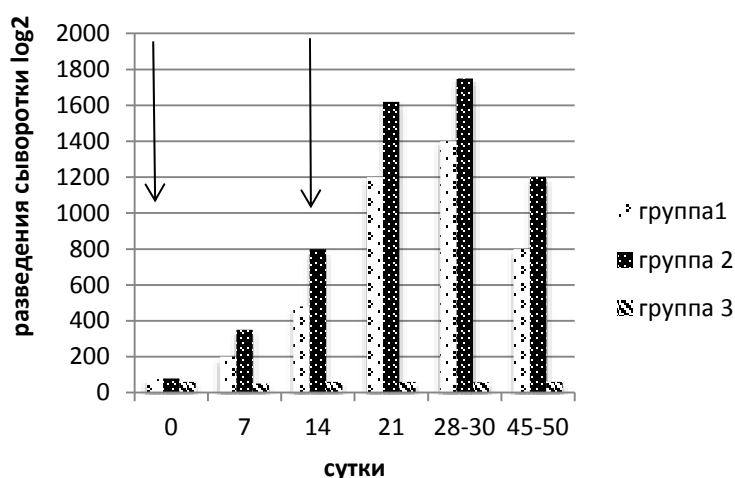


Рис. 23 – Динамика накопления специфических антител в сыворотке крови мышей в результате двукратной ДНК-иммунизации (n=3).
Группа 1- мыши, которым вводили плазмидные ДНК pCI-neoGn/Gc на 3фР,
Группа 2 – мыши, которым вводили плазмидные ДНК pCI-neoGn/Gc/CpG;
Группа 3 – контрольная группа мышей.
Стрелками указаны сроки введения рекомбинантной ДНК.

Полученные нами результаты изучения динамики накопления специфических антител показали, что в ответ на ДНК-иммунизацию она характеризуется небольшим подъемом титров антител после первого введения (рисунок 23). Повторное введение рекомбинантных плазмид с интервалом 14 суток не привело к значительному увеличению титра специфических антител, который через 7 дней после бустер-дозы находился в диапазоне 1:1200-1:1600, через 14 дней - 1:1400-1:1800, что превышало уровень антител к 14 дням после первого введения плазмид в 2,2-2,9 раза. Затем титр антител снижался и к 45-50 суткам (срок наблюдения) составлял 1:800-1:1200. Титры вируснейтрализующих антител в этих группах

постепенно нарастали к 25 суткам и составили 1:8-1:16; 1:16-1:32 в группах 1 и 2, соответственно. В результате проведения исследований установлены более высокие титры антител во второй группе мышей, которым вводили препарат рекомбинантных плазмид с генетическим адъювантом CpG ОДН.

В дальнейшем изучена динамика развития гуморального иммунитета в результате введения двух бустер доз ДНК-конструкций pCI-neo/Gc3/3 и pCI-neo/Gn/2/2. Третье введение рекомбинантных ДНК проводили через 50-56 дней после второго введения на фоне снижения титров специфических антител.

Результаты оценки способности экспрессируемых *in vivo* рекомбинантных белков Gn и Gc индуцировать синтез и динамику накопления специфических сывороточных антител в результате 3-кратной ДНК-иммунизации представлены на рисунке 24.

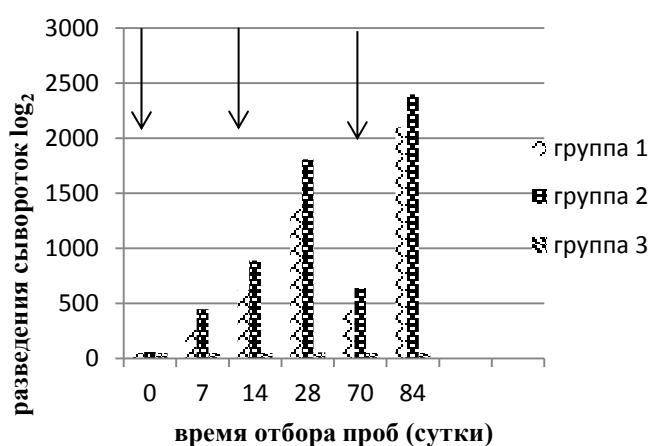


Рис. 24 – Динамика накопления специфических антител в сыворотке крови мышей в результате трехкратной ДНК-иммунизации (n=3).

Группа 1- мыши, которым вводили рекДНК pCI-neoGn/Gc, Группа 2 – мыши, которым вводили рекДНК pCI-neoGn/Gc +CpG;

Группа 3 – мыши, которым вводили плазмиду без вставки. Стрелками указаны сроки введения плазмидной ДНК.

Проведенные исследования показали, что используемые для ДНК-иммунизации рекомбинантные плазмиды являются безопасными и безвредными препаратами, так как за период наблюдения (85 суток) привитые белые мыши оставались клинически здоровыми, каких-либо нарушений физиологического состояния иммунизированных животных отмечено не было.

Результаты изучения развития гуморального иммунитета в результате ДНК-иммунизации показали, что она отличается от сероконверсии при

стандартной схеме иммунизации белком. Ответ на ДНК-иммунизацию характеризовался увеличением уровня специфических антител после первого и второго введения до 1:1500-1:1800 только во второй группе животных, которым вводили препарат рекомбинантных плазмид с адъювантом CpG ОДН. Затем к 70 суткам после первой иммунизации титр АТ снижался до уровня 1:400-1:600 и, при условии дальнейшей (третьей) иммунизации титр антител значительно повышался (в 4 и более раз). Через 14 суток после третьего введения уровень вируснейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных мышей составил 1:64-1:128. Также как и при 2-кратной иммунизации отмечены более высокие титры антител в группе мышей, которым вводили препарат рекомбинантных плазмид в комбинации с синтетическим CpG ОДН (Рисунки 23 и 24).

Другой путь усиления иммунного ответа на введение генетического материала предусматривает введение рекомбинантной ДНК в составе микрочастиц. Для доставки рекомбинантной ДНК, предохранения ее от воздействия клеточных протеаз и создания депо использованы полиэлектролитные биосовместимые и биodeградируемые микрокапсулы и микрогранулы состава поли-L-лизин/альгинат, в которые были иммобилизованы рекомбинантные плазмиды, содержащие гены гликопротеинов Gn и Gc вируса ЛДР, предварительно сорбированные микрочастицами CaCO_3 . В качестве иммуностимулирующего адъюванта также использовали CpG ОДН. Результаты изучения индукции синтеза специфических, в том числе вируснейтрализующих антител у привитых белых мышей массой 18-25 г различных групп представлены в таблице 38.

Результаты исследований, представленные в таблице 38, показали, что в зависимости от вводимого иммуногена накопление протективного уровня ВН антител происходило к 14-21 суткам и достигало максимума к 28 суткам: после первой ДНК-иммунизации уровень ВН антител оставался низким и на 7 сутки составлял 1:4-1:8., к 28-30 суткам их уровень составлял 1:32-1:64.

Таблица 38

Кинетика развития гуморального иммунитета при введении рекомбинантной ДНК в различных комбинациях

Характеристика препарата	Время отбора проб и контрольного заражения	Иммунореактивность вводимых препаратов		
		Активность сывороток ($\log_2$) (n=5)		
		РН	РЗНГА	нТФ ИФА*
Группа №1 рек. Gn/Gc, гранулы	7 суток	2,8±0,3	5,46±0,13	7,6±0,25
	14 суток**	3,7±0,16	5,9±0,23	9,6±0,
	28-30 суток	5,2±0,5	7,1±0,16	10,2±0,15
	84 суток***	6,4±0,27	9,2±0,25	12,2±0,32
Группа №2 рек. Gn/Gc, CpG, гранулы	7 суток	3,1±0,4	6,4±0,19	7,5 ±0,35
	14 суток**	4,2±0,23	6,7±0,27	10,4±0,12
	28-30 суток	5,8±0,1	8,3±0,21	11,1±0,4
	84 суток***	6,9±0,28	9,4±0,3	12,4±0,18
Группа №3 рек. Gn/Gc,	7 суток	2,1±0,3	4,5±0,2	6,8±0,15
	14 суток**	3,5±0,4	5,7±0,31	9,7±0,6
	28-30 суток	5,1±0,32	6,2±0,5	10,4±0,42
	84 суток***	5,8±0,1	7,5±0,31	11,1±0,24
Группа №4 рек. Gn/Gc, CpG,	7 суток	3,1±0,24	5,1±0,34	7,3±0,14
	14 суток**	3,8±0,18	5,3±0,15	9,1±0,25
	28-30 суток	5,6±0,13	7,4±0,5	10,5±0,6
	84 суток***	6,4±0,26	8,6±0,26	11,2±0,20
Группа №5 рек. Gn/Gc, капсулы	7 суток	2,1±0,17	5,4±0,2	7,1±0,15
	14 суток**	4,2±0,23	6,7±0,19	9,8±0,3
	28-30 суток	6,2±0,5	8,1±0,34	11,3±0,4
	84 суток***	6,9±0,4	6,8±0,2	11,8±0,3
Группа №6 рек. Gn/Gc, CpG, капсулы	7 суток	2,4±0,31	5,6±0,28	7,2±0,27
	14 суток**	4,8±0,3	6,9±0,7	10,2±0, 15
	28-30 суток	6,1±0,26	7,4±0,26	11,4±0,21
	84 суток***	7,4±0,37	9,1±0,12	11,9±0,14
Контрольная группа		1,5±0,2	2,8±0,5	5,4±0,12

Примечание: * - средний титр АТ в группе±стандартная ошибка; ** - отмечено повторное введение препарата рекомбинантных ДНК; *** - 14 суток после второй бустер-дозы.

Установлено в ходе исследований, что гомологичная прайм-бустерная ДНК-иммунизация вызывала значительное нарастание титра сывороточных антител только после третьего введения. Среднее значение коэффициента вариации титра антител для каждой группы не превышало 3,8-4,0%, при среднем значении стандартного отклонения $<0,5 \log_2$. Исследования на мышах показали, что индукция гуморального иммунитета усиливалась при использовании CpG ОДН в качестве адъюванта. Также высокий уровень индукции специфических АТ, в том числе ВН обеспечивали рекомбинантные плазмиды с CpG ОДН, заключенные в биodeградируемые капсулы и гранулы. Причем отмечен пролонгированный ответ на введение плазмид, заключенных в капсулы. В ходе проведенных исследований обнаружено, что специфические сыворотки, имеющие титр ВН антител ниже 1:16 были отрицательными в непрямом ТФ ИФА, так как их ОП₄₀₅ не превышала в 2,1 раза уровня таковой сывороток мышей контрольной группы. При проведении исследований установлено, что в результате трехкратной гомологичной ДНК прайм-бустерной иммунизации происходит нарастание концентрации специфических антител в сыворотке крови привитых животных (титр ВН антител 1:64-128); снижение фонового уровня реакции ТФ ИФА с антигенами гетерологических вирусов, что свидетельствует об усилении аффинности и авидности синтезируемых антител.

Учитывая данные J. Lorenzo и др. (371; 372), J. VanVuren и др. (300), Lagerqist и др. (344), что животные даже при низком (или отсутствии) значении титров специфических АТ были устойчивы против вирулентного вируса, предполагая, что клеточный иммунитет играет также немаловажную роль в обеспечении устойчивости животных против ЛДР. Поэтому нами проведены исследования по изучению развития клеточного иммунного ответа в результате ДНК-иммунизации. Активацию клеточного звена иммунитета изучали по наличию мембранных CD рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток. В опытах использовали кровь, обработанную антикоагулянтами и спленоциты иммунизированных мышей.

Эффект воздействия вводимого материала на содержание Т- и В-лимфоцитов, соотношение Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, выявляемый по достоверному увеличению/снижению данных показателей относительно значений у контрольных интактных доноров (здоровых животных, не подвергавшихся воздействию материалов) представлен в таблице 38.

Как видно из результатов, представленных в таблице 39, праймирование иммунной системы рекомбинантными ДНК, заключенными в биосовместимые микрочастицы вызывало активацию антиген-специфических иммунокомпетентных клеток; способствовало ранней генерации CD8 и CD4 Т-клеток, которое сохранялось в течение 7 суток (срок наблюдения). В этот период препараты рекомбинантных плазмид стимулировали процесс активации и пролиферации Т- и В-клеток.

На 3 сутки после введения отмечено увеличение количества лейкоцитов во всех группах; в группах № 2, 3, 6 - относительное содержание лимфоцитов. Различие показателей параметров иммунограммы для каждой группы в сравнении с контрольной статистически значимы при $p < 0,05$. Коэффициент вариации для каждой группы не превышал 3,5-3,8%, при средней ошибке $< 0,65 \log_2$. Количество CD3 - интегрального показателя клеточного звена иммунитета находилось практически в пределах нормы; относительное количество CD8 Т-клеток, превышало уровень контрольной группы примерно в 2-3 раза; содержание CD4Т-клеток находилось в верхних пределах нормы. Иммунорегуляторный индекс – отношение CD4/CD8 также оставался в пределах нормы, подтверждая отсутствие неблагоприятного воздействия вводимых препаратов рекомбинантных ДНК на иммунную систему мышей. Данные иммунограмм также свидетельствуют о преобладании в первые 7 суток после введения рекомбинантных плазмид развития клеточного звена иммунитета.

Таблица 39

Иммунный статус белых мышей в первые сутки после введения препаратов рекомбинантных плазмид.

Показатели (n=3)	Норма	3 суток после введения						
		контроль	1 гр.	2 гр.	3 гр.	4 гр.	5 гр.	6 гр*.
Лейкоциты, 10 ⁹	9,8 -11,7	11,1	14,2 ↑	18,4↑	15,6 ↑	16,1 ↑	10,7	10,8
Лимфоциты %	42,3-48,5	49	44	61 ↑	52↑	48	49	56 ↑
CD 3, %	60-66,7	63	68	78 ↑	64	65	70 ↑	71 ↑
CD 4, %	47 – 52	45	48	53	48	54 ↑	48	44 ↓
CD 8, %	11-13	12	29 ↑	34 ↑	28 ↑	37 ↑	39 ↑	37 ↑
CD 20, %	11-12,7	12	14	15 ↑	11	10 ↓	12	11
CD 4/CD 8	>1	2,25	2,4	2,8	3,2 ↑	3,1	2,8	2,6
IgM, г/л	0,5-1,0	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9
IgG, г/л	2,0-3,0	2,1	3,4	7,8 ↑	5,4 ↑	8,3 ↑	3,0	2,7
Фагоцитарный показатель %	40-50	37	51	54↑	47	61 ↑	49	51
Показатели (n=3)	Норма	7 суток после введения						
		контроль	1гр.	2 гр.	3 гр.	4 гр.	5 гр.	6 гр.
Лейкоциты, 10 ⁹	9,8 -11,7	9,8	9,1	9,3	9,8	10,5	9,2	9,5
Лимфоциты %	42,3-48,5	49	47	54 ↑	50 ↑	52 ↑	55 ↑	49
CD 3, %	60-66,7	61	65	63	54 ↓	62	69 ↑	70 ↑
CD 4, %	47 – 52	48	58 ↑	54↑	48	52	57	58
CD 8, %	11-13	12	34 ↑	29 ↑	36 ↑	34 ↑	↑31	↑28
CD 20, %	11-12,7	10 ↓	12	14 ↑	11	15↑	12	11
CD 4/CD 8	>1	2,25	2,4	2,25	2,8	2,1	2,9	2,9
IgM, г/л	0,5-1,0	0,6	1,5	1,8	1,3	1,5	1,1	1,2
IgG, г/л	2,0-3,0	2,3	3,2 ↑	3,9 ↑	3,1	2,8	2,3	2,7
Фагоцитарный показатель %	40-50	42	49	47	49	47	50	54

Примечание: стрелками показано увеличение/снижение уровня показателей; * - расшифровка групп представлена в таблице 38.

Таким образом результаты проведенных исследований показали, что гомологичная прайм-бустерная ДНК-иммунизация индуцирует развитие раннего как клеточного, так и гуморального иммунного ответа; при ДНК-иммунизации экспрессия генов и синтез *in vivo* гликопротеинов вируса ЛДР приводит к активации Т- и В-клеток; также способствует ранней генерации клеток, имеющих фенотип и функции клеток памяти.

4.3.2.4. Эффективность воздействия различных систем доставки иммуногена на развитие иммунного ответа против лихорадки долины Рифт

Различия в способе доставки и представления антигена, развития иммунного ответа при обычной белковой и ДНК-иммунизации является одним из максимально интересующих и важных вопросов, как фундаментальной иммунологии, так и практической вакцинологии. При конструировании вакцин важно проведение исследований в этом направлении, так как желательно установить заранее вид иммунного ответа, необходимого для защиты от выявленного возбудителя инфекции.

В связи с этим нами проведено на лабораторной модели (аутбредные мыши) сравнительное изучение формирования иммунного ответа при различных системах доставки антигена и их комбинации. Для этого было сформировано пять групп в каждой по 20 белых мышей, которых иммунизировали внутримышечно: 1 группа - 3-кратная ДНК-иммунизации рекомбинантными ДНК_{Gn/Gc} (50 мкг/мышь) с CpG ОДН в составе биodeградируемых микрогранул; 2 группа - двукратно инактивированным цельновирионным сорбированным на ГОА антигеном вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» (в дозе 0,5 см³ 256 ГАЕ); 3 группа - методом гетерогенной прайм-бустерной иммунизации – праймирование рекДНК_{Gn/Gc}, бустирование через 14 дней инактивированным ГОА-сорбированным антигеном вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ»; 4 группа - однократно аттенуированным вирусом ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» в дозе 10^{4,0} ТЦД_{50/см3}; 5 группа – контрольная, интактные белые мыши. Пробы

крови и спленоцитов для изучения индукции иммунного ответа и воздействия на иммунную систему животных различных типов вакцин отбирали на 7, 14, 28-30, 84 и 3, 7, 10 день после первой иммунизации, соответственно.

Результаты изучения развития гуморального иммунитета и устойчивости аутбредных белых мышей против летальной дозы вирулентного вируса ЛДР при введении различных типов вакцин представлены в таблице 40.

Таблица 40

Гуморальный и протективный иммунный ответ аутбредных белых мышей на введение препаратов различных типов вакцин (прототипов)

Наименование	№ группы	Время отбора проб и контролн. заражения	Иммунореактивность вводимых препаратов, log ₂ (n=3)			
			РН	РЗНГА	нТФ ИФА	%выживаемост и
Гомологичная прайм-бустерная иммунизация	Группа №1	7 суток	2,6±0,23	6,2±0,24	8,9±0,15	н/и*
		14 суток	3,4±0,42	7,4±0,27	10,5±0,17	н/и
		28-30 суток	5,3±0,15	7,8±0,5	10,8±0,5	76±0,31
		84 суток	6,6±0,41	8,5±0,34	11,2±0,36	95±0,2
	Группа №2	14 суток	3,2±0,25	6,4±0,18	9,4±0,43	53±0, 5
		28-30 суток	5,9±0,41	8,7±0,23	11,3±0,5	95±0,3
Гетерологичн. прайм-бустерная иммунизация	Группа №3	7 суток	2,8±0,24	6,3±0,28	8,7±0,4	н/и
		14 суток	4,1±0,32	7,2±0,25	10,5±0,3	н/и
		28-30 суток	6,7±0,18	10,1±0,12	11,7±0,27	97±0,4
Аттенуированный вирус группа №4		7 суток	3,1±0,15	6,6±0,26	9,4±0,4	н/и
		14 суток	4,5±0,13	8,1±0,17	10,1±0,2	н/и
		28-30 суток	6,4±0,29	9,3±0,25	11,5±0,42	97±0,3
Контрольная группа №5			1,2±0,1	1,2±0,37	5,1±0,5	0

Примечание: * н/и – не исследовали.

Результаты, представленные в таблице 40 свидетельствуют, что рекомбинантные ДНК-плазмиды и живая вакцина при однократном введении индуцировали синтез специфических антител, выявляемый на детектируемом

уровне через 7 суток после введения в пределах 1:128-200 в РНГА; 500-800 в нТФ ИФА; 1:4-1:8 – в РН.В то время как инактивированная вакцина индуцировала такой же уровень антител только к 14 суткам после однократного введения препарата.

Повторная ДНК-иммунизация вызывала к 28-30 суткам индукцию синтеза вирусспецифических АТ в пределах 1:1024-2048; ВН – 1:32-1:64 и защиту 75-76% привитых животных от заражения вирулентным вирусом. Трехкратная иммунизация обеспечивала повышение уровня АТ через 14 дней после введения ВН до 1:128, вирусспецифических до 1:2048-1:4096 и защиты до 95%. Введение рекДНК_{Gn/Gc} с CpG ОДН в составе биodeградируемых микрогранул способствовало повышению уровня синтезируемых антител.

При двукратном введении лабораторных образцов инактивированного антигена титры вируснейтрализующих антител в этот же период был несколько ниже и находились в пределах 1:32-1:64, титр специфических антител в нТФ ИФА составил 1:2048-4096.

Гетерологичная прайм-бустерная иммунизация рекДНК_{Gn/Gc} → ГОА-сорбированный инактивированный антиген индуцировала через 14 суток после второй иммунизации более сильный антительный ответ, чем двукратное введение только ДНК-вакцины или инактивированного антигена. Иммунизирующая доза (0,5 см³/мышь, 256 ГАЕ) инактивированного антигена, введенная через 14 суток после праймирования рекДНК_{Gn/Gc} с CpG ОДН в составе биodeградируемых микрогранул, индуцировала повышенный синтез ВН антител до 1:64-1:128 на 14 сутки после введения, титр специфических антител в ТФ ИФА на этот период составлял 1:2048-4096.

Также системные иммунные реакции в ответ на введение различных антигенов (прототипов вакцин) контролировали по состоянию цитокинового профиля иммунизированных мышей. Оценить содержание цитокинов *in vivo* довольно сложно, поскольку они в сыворотке и других биологических жидкостях быстро разрушаются. Поэтому экспрессию цитокинов определяли по наличию их мРНК методом ОТ-ПЦР на основе пар праймеров для

цитокинов в спленоцитах и мононуклеарах периферической крови белых мышей. Полученные результаты представлены в таблице 41.

Результаты исследования цитокинового профиля, представленные в таблице 41 показали, что вводимые препараты в разные сроки после введения активируют транскрипцию различных цитокинов, способствуя регуляции механизмов клеточного и гуморального иммунитета. Через 3 суток (срок наблюдения) после введения практически всех типов вакцин отмечена активация экспрессии генов цитокинов первого типа - интерферона- α (ИНФ- α), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и в группах 1, 2 и 4 – ИЛ-1 β . Активированными макрофагами секретировался ИЛ-12.

Таблица № 41

Экспрессия генов цитокинов, в мононуклеарах периферической крови и спленоцитах мышей, иммунизированных различными препаратами.

Группы мышей	Наличие мРНК цитокина (+) или отсутствие (-) мРНК цитокина в мононуклеарах периферической крови/спленоцитах мышей (n=3)										
	ИНФ- α/β	ИЛ-1 β	ФНО- α	ИЛ-8	ИЛ-6	ИНФ- γ	ИЛ-2	ИЛ-12	ИЛ-18	ИЛ-4	ИЛ-10
3 суток											
плазмида без вставки	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
1 группа	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
2 группа	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
3 группа	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
4 группа	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
7 суток											
1 группа	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2 группа	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
3 группа	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
4 группа	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
10 суток											
1 группа	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
2 группа	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
3 группа	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
4 группа	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
21 сутки											
1 группа	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
2 группа	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
3 группа	+		-	-	-	+	-	-	-	+	+
4 группа	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+

Группа 1- ДНК_{Gn/GcV} гранулах с CpG;

Группа 2– аттенуированный штамм «1974-ВНИИВВиМ»;

Группа 3– инактивированный антиген вируса ЛДР;

Группа 4 - ДНК_{Gn/Gc} в гранулах с CpG→инактивированный антиген.
«+»- положительные пробы; «-»- отрицательные пробы мРНК цитокинов.

Рекомбинантные плазмиды и аттенуированный штамм вируса ЛДР оказывали одинаковое воздействие на синтез провоспалительных цитокинов на уровне их транскрипции. Отмечен высокий уровень транскрипции ИЛ-1 β ; ИЛ-6 и ИЛ-2. Инактивированный антиген активировал экспрессии генов ИФН- β , ИЛ-6; ИЛ-12; ИЛ-18:

- на 3-10 сутки после введения рекомбинантных плазмид отмечена индукция биосинтеза центрального регуляторного цитокина ИЛ-2 и на 7-10 сутки - ИФН- γ , который наиболее часто используется в качестве маркера для идентификации ЦТЛ. В этот период отмечена активация экспрессии генов цитокинов - ИЛ-8; ИЛ-4 и ИЛ-18, которые способны подавлять экспрессию генов ИФН- α ; ФНО- α и ИЛ-12.

- на 10 сутки все виды вакцин индуцировали синтез ИЛ-1 β , ИФН- α/β и ИФН- γ ; ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-10. В этот период отмечен высокий уровень транскрипции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. ИЛ-4 – наиболее широко используемый маркер при идентификации Th2-клеток.

Экспрессия генов ИЛ-18, ИЛ-12 и ИФН I типа в группах мышей, иммунизированных инактивированным антигеном и ДНК-конструкциями, в отличие от 4 группы мышей, которым вводили аттенуированный штамм.

Таким образом результаты исследований показали, что наличие экспрессии цитокинов ИЛ-2; ИЛ-12; ИФН- α ; ФНО- α ; ИФН- γ и ИЛ-1 β свидетельствовало о функциональной активности иммунитета Th1-типа в первые 3-7 суток, преобладающего в группах, иммунизированных рекомбинантными плазмидами и аттенуированным штаммом вируса ЛДР; экспрессии ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 - о функциональной активности иммунитета Th2-типа, выявленной на 7 сутки в группах мышей, иммунизированных аттенуированным штаммом и ГОА-сорбированным инактивированным антигеном вируса ЛДР; на 10 сутки – во всех группах, кроме контрольной.

Таким образом наши исследования показали, что ДНК-иммунизация индуцирует развитие как клеточного, так и гуморального иммунитета, индуцируя, соответственно, активацию экспрессии генов цитокинов ИФН- γ и ФНО- α ; ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10. Идея гетерологичной прайм-бустерной иммунизации сочетала оба и гуморальный, и клеточный иммунитет, вызванный каждой системой доставки антигена в отдельности.

Состояние функциональной активности иммунной системы в целом имеет жизненно важное значение для организма и обозначается понятием «иммунный статус». Клеточные реакции адаптивного иммунитета обеспечиваются Т-лимфоцитами, имеющими специфические поверхностные антигенные маркеры, обозначенные символами CD (cluster differentiation): CD3 Т-лимфоцитов; CD4 Т-лимфоцитов-хелперов; CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов и CD20 - активированных В-лимфоцитов. Результаты определения иммунного статуса белых мышей, иммунизированных различными иммуногенами, представлены в таблице 42.

Таблица 42

Иммунный статус белых мышей после иммунизации различными антигенными препаратами

Показатели (n=3)	Норма	«0»	1*	2*	3*	4*	5*
Лейкоциты, 10^9	9,8 -11,7	10-10,7	11,5-11,8	11,2-11,8	11,-11,4	11,9-12,1	11-11,2
Лимфоциты, 10^9	4,1-5,0	4,3-4,8	3,5-3,7 ↓	4,3-4,6	4,5-4,9	4,6-5,0	4,1-4,5
Лимфоциты %	42,3-48,5	43-45	35-40 ↓	42-44	43-45	47-48	46-48
CD 3, %	60-66,7	63-65	52-54 ↓	62-64	59-62	63-65	65-66,4
CD 3, 10^9	2,9 – 3,4	3,0-3,2	2,2-2,4 ↓	3,1-3,3	3,0-3,2	2,8-3,2	2,9-3,3
CD 4, %	47 – 52	41-45	34-36 ↓	48-51	49-52	49-53	48-51
CD 8, %	11-13	11-12	14-16 ↑	11-13	11,8-12	12-14↑	12-14↑
CD 20, %	11-12,7	11-11,5	12-14 ↑	15-16 ↑	11-11,9	12-12,8	14,7-15↑
CD 20, 10^9	0,6-0,8	0,6-0,7	1-1,2 ↑	1,2-1,4↑	0,7-0,9	0,5-0,8	1,6-1,8↑
CD 4/CD 8	>1	1,9-2,4	2,0-2,25	2,5-3,2 ↑	2,4-2,8 ↑	2,7-3,2	2,4-3,0
IgM, г/л	0,5-1,0	0,6-0,8	1,0-1,2 ↑	0,8-1,3↑	0,7-0,9	0,9-1,0	0,8-0,9
IgG, г/л	2,0-3,0	2,3-2,5,	2,5-3,0	3,0-3,5 ↑	2,1-2,4	2,4-2,7	2,8-3,9↑
Фагоцитарный показатель %	40-50	45-47	56-59 ↑	42-50	42-47	43-48	52-57

Группы мышей: 0* - интактная; - 1* – живая вакцина ЛДР 10 дней;

2* – инактивированная вакцина 10 дней; 3* – плазмида без вставки 10 дней;

4* – рекомбинантная плазмида 10 дней;

5* - рекомбинантная ДНК_{Gn/Gc}/инактивированная вакцина 21 день (7 дней после бустер-дозы).

Как показали результаты исследований, представленные в таблице 42, что препараты ГОА-сорбированного инактивированного антигена, рекомбинантных плазмид не оказывали иммуносупрессивного воздействия на иммунную систему привитых белых мышей, в отличие от живой аттенуированной вакцины, о чем свидетельствуют данные иммунограмм, представленные в таблице 42. Стимулировали в течение первых 7 суток активацию и пролиферацию CD4⁺, CD8⁺Т-клеток, превышающую уровень контрольной группы примерно в 3 раза. Тогда как иммунорегуляторный индекс – отношение CD4/CD8, уровень активированных В-лимфоцитов и фаготитарный показатель оставались в пределах нормы, что свидетельствует о нормальном состоянии иммунной системы мышей и преобладании на данном отрезке времени в результате иммунизации клеточного звена иммунитета.

Таким образом, полученные данные показали, что рекомбинантные плазмиды введенные белым мышам массой 18-25 г, по 50-100 мкг/мышь в гранулах, с адъювантами или без них оказывали стимулирующее воздействие на систему врожденного и развитие раннего (3-7 суток) адаптивного иммунитета, о чем свидетельствуют данные иммунограмм, определенный цитокиновый уровень и синтез специфических сывороточных антител.

Результаты проведенных исследований показали, что введение плазмидной ДНК с генетическим адъювантом CpG в составе биосовместимых биodeградируемых микрогранул и микрокапсул усиливало, пролонгировало продукцию ИЛ-6, ИЛ-12 и ИФН- γ и приводило к синтезу более высоких титров специфических антител. Синергизм праймирования рекомбинантной ДНК и бустер-эффект соответствующего рекомбинантного белка или инактивированного антигена вируса ЛДР обеспечивал высокую активность CD4⁺, CD8⁺Т-лимфоцитов; аффинность и авидность синтезируемых специфических антител.

В ходе проведения исследований установлено, что последовательное введение рекДНК_{Gn/Gc}→ГОА-сорбированный инаktivированный антиген вызывало наиболее эффективные иммунные реакции по сравнению с гомологичными стратегиями, подтверждая высокий потенциал стратегии гетерологичной прайм-бустерной иммунизации. Праймирование рекДНК_{Gn/Gc} привело к индукции развития раннего (3-7 сутки) иммунитета преимущественно Th1 типа, судя по выявленному цитокиновому профилю и преобладанию пролиферации CD4⁺, CD8⁺Т-лимфоцитов. Также показано, что повышение иммуногенности первоначального праймирования за счет генетического иммуностимулятора и биосовместимых микрочастиц повлияло на усиление полноценного, в том числе протективного, иммунного ответа на последующую бустер-дозу инаktivированного антигена. О чем свидетельствовали: 3-кратное увеличение Т-клеточного ответа; нарастание титра специфических антител к гликопротеинам вируса ЛДР и вируснейтрализующих антител; 97-98% защита вакцинированных животных от заражения летальной дозой вируса ЛДР. К тому же разработанная стратегия вакцинации против ЛДР - гетерологичная прайм-бустерная иммунизация, предусматривающая применение антигенов гликопротеинов и инаktivированного вируса - позволяет применять непрямой или конкурентный ТФ ИФА на основе рекомбинантного нуклеопротеина вируса ЛДР и соответствующих МКА для дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (так называемую стратегию DIVA-анализа).

Предлагаемая стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации рекДНК_{Gn/Gc}→ГОА-сорбированный инаktivированный вирусный антиген оптимально комбинирует с эффектом синергизма способность ДНК-иммунизации индуцировать ранний клеточный иммунитет и способность инаktivированной вакцины вызывать развитие гуморального иммунного ответа, а также обеспечивать безопасность производства и применения. Кроме того, четко определенный процесс анализа для изготовления всех ДНК-вакцин делает их производственный процесс

стандартным. Учитывая высокую степень эффективности и безопасности данной стратегии весьма актуально и перспективно оценить ее на целевых сельскохозяйственных животных.

Предложенная стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации с использованием различных систем доставки иммуногена обеспечивает быстрое развитие раннегосбалансированного полноценного иммунного ответа, обеспечивая в короткие сроки защиту от заражения вирулентным вирусом в случае его заноса; может быть использована для специфической профилактики, купирования и сдерживания распространения транграничных особо опасных инфекций в угрожаемой зоне.

4.4. Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) особо опасных инфекций (на примере ЛДР)

Основываясь на полученных результатах экспериментальных исследований и детальном анализе опубликованных данных литературы, нами разработана «Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) ЛДР», представленной на рисунке 25. Целью которой является содействие организации мер противодействия распространения и искоренения болезни при угрозе ее возникновения (заноса возбудителя). Результаты лабораторных исследований могут быть использованы в случае непредвиденных обстоятельств для дальнейшей оптимизации в короткие сроки технологических процессов и организации экстренного развертывания промышленного производства необходимых количеств диагностических и вакцинных препаратов

Представленная на рисунке 25 предлагаемая схема стратегии ответных мер в случае угрозы возникновения ЛДР, предусматривает использование данных среднесрочного пространственного и временного прогнозирования потенциальных вспышек ЛДР; лабораторных исследований по созданию библиотеки генов иммунодоминантных белков вируса, эффективных диагностических, вакцинных и терапевтических препаратов; для оценки необходимых объемов производства; отработки в кратчайшие сроки (4-6

месяцев) технологических регламентов и развертывания промышленного производства необходимых количеств реагентов для конструирования тест-систем ранней диагностики и средств иммунизации, обеспечивающих, соответственно, своевременное выявление патогена (24 часа) и раннюю защиту (3-7 суток) восприимчивых животных от заражения вирулентным вирусом.

В сочетании с целевым эпизоотологическим, серологическим мониторингом и энтомологическим надзором предлагаемая схема является еще одним инструментом предотвращения возникновения, распространения инфекции и минимизации экономических последствий.

Использование: рекомбинантных белков, аналогов иммунодоминантных вирусных белков, гарантирует безопасность и стандартность тест-систем иммуноанализа, исключает использование живого вируса в угрожаемой зоне; использование аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» для изготовления инактивированного антигена и в перспективе – инактивированной вакцины позволит проводить работу в условия ВЛГ-2, и обеспечит безопасность производства вакцины и ее применение; стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации - $\text{рекДНК}_{\text{Gn/Gc}} \rightarrow \text{ГОА-сорбированного инактивированный антиген вируса ЛДР}$ обеспечит быстрое развитие раннего иммунного ответа обоих звеньев, защиту восприимчивых животных от заражения вирулентным вирусом. Иммунизация животных препаратами, содержащими нереплицирующийся вирус, позволит проводить вакцинацию животных всех возрастных групп и физиологического состояния животных; применить стратегию дифференциации вакцинированных и инфицированных животных (DIVA) с использованием ТФ ИФА на основе рекомбинантного нуклеопротеина вируса ЛДР и МКА. Праймирование рекомбинантными ДНК позволит использовать альтернативные методы безигольной вакцинации.

К тому же предложенная «Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) ЛДР» подходит непосредственно или может быть легко адаптирована для других

экзотических, малоизученных и карантинных особо опасных инфекций, которые представляют серьезную угрозу здоровью животных и населения.

Проведенные в данной работе исследования показали, что ДНК-иммунизация представляет собой безопасную и эффективную стратегию праймирования (грунтовок) иммунного ответа на антиген, кодируемый в плазмидном векторе, и позволяет использовать ее при получении моноспецифических сывороток, МКА узкой направленной специфичности. Использование МКА и рекомбинантных белков – аналогов вирусных антигенов позволяет разработать стандартизованные высокочувствительные специфичные тест-системы иммуноанализа для выявления возбудителей инфекционных болезней и антител к ним.

Экспрессия генов гликопротеинов вируса ЛДР, их синтез *in vivo* (*in situ*) при ДНК-вакцинации является основой успешного подхода к созданию вакцин нового поколения против ЛДР, а также разработки стратегий гомологичной и гетерологичной прайм-бустерной иммунизации с целью профилактики инфекционных болезней. Предложенная стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации: ДНК_{Gn,Gc}/инактивированная вакцина против ЛДР обеспечивает раннее развитие обоих звеньев иммунитета и защиту животных от заражения вирулентным вирусом. Использование вакцин, содержащих нереплицирующийся вирус создает возможность иммунизации молодняка и беременных животных.

Применение разработанной на примере ЛДР «Схемы обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) ЛДР» (Рисунок 25) позволит в короткие сроки провести экстренное развертывание создания и промышленного производства необходимого количества средств диагностики и специфической иммунизации против особо опасных экзотических и малоизученных инфекций.

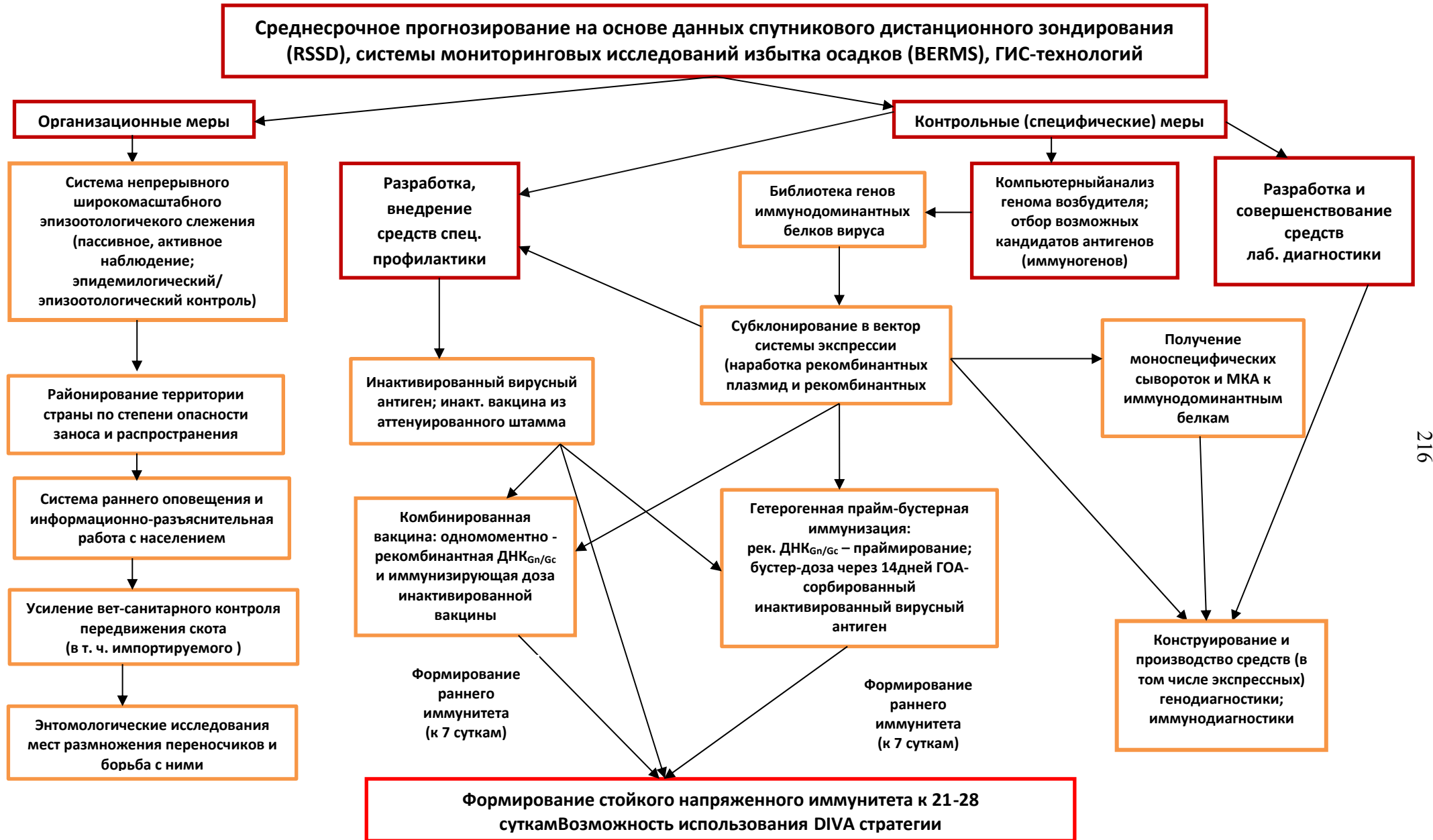


Рисунок 25 – Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) ЛДР

5. Обсуждение результатов

По данным Международного Эпизоотического Бюро за 2014 г. в мире зарегистрировано 10 865 вспышек особо опасных болезней животных. Региональная комиссия МЭБ по Европе (2012 г.) отметила, что в перечень болезней, за которыми признается угроза заноса в европейские страны, входят наряду с другими инфекционными болезнями высокопатогенный грипп птиц; в числе экзотических для Европы болезней чаще других упоминается лихорадка долины Рифт [122; 614; 615; 622].

Приоритет исследований, касающийся ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла обуславливается: непрекращающимися вспышками гриппа птиц, вызванными реассортантными вирусами пятого и седьмого подтипов [39; 42; 46; 223; 282; 286; 372; 424; 452; 498; 551]; появлением вспышек болезни Ньюкасла практически на всех континентах, вызванных велогенным вирусом VI-VIII генотипов второго класса, способных поражать до 100% вакцинированной птицы [136; 144; 182; 65; 68; 85]; драматическими событиями 2010-2014 гг. в Южной и Западной Африке, связанными с эпизоотиями/эпидемиями ЛДР. Повышенный поток эмигрантов из стран этого региона усугубляет возможность заноса болезней в Европу. Также не исключена возможность проведения биотеррористических актов [48; 64; 180; 184; 380; 395; 526; 539].

Все это послужило основанием проведения исследований по разработке новых и совершенствованию существующих средств и методов ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла и специфической профилактики, обеспечивающих развитие полноценного иммунитета, в том числе протективного.

Актуальность проведенных в работе исследований подтверждается сообщениями Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору о напряженной обстановке в мире по высокопатогенному гриппу птиц (ВПП) и обнаружение случаев выявления гриппа птиц H5N1 от дикой птицы в 2015 году на территории Астраханской, Новосибирской областей,

Республики Тыва, Забайкальского края; H5N8 в Абыйском районе Якутии, что может представлять угрозу распространения ВПП. Выявление в 2011-2014 гг. нового типа D вируса гриппа свиней и КРС в США, Франции и Китае [183; 436; 626; 273; 274; 299]. Как сообщает пресс-служба государственного комитета по ветеринарии «правительства» Крыма появление 2016 г. вспышек болезни Ньюкасла среди домашней птицы в 4 районах Крыма., что не исключает возможности распространения инфекция среди популяции домашних птиц. Вызывают тревогу и обеспокоенность случаи непредсказуемых вспышек ЛДР на новых территориях, находящихся далеко за пределами традиционных эндемичных зон с повышением процента и диапазона фатальных осложнений болезни. Внезапное появление ЛДР в Средиземноморье в 1977-1978гг.; на острове Мадагаскар в 1991г. [417; 365]; на Аравийском полуострове в 2000-2001 гг. [105; 301; 377; 400]; на Коморских островах в Индийском океане в 2007-2009 гг. [487; 528; 626; 345]. Выявление в 2010 году, (Германия) и, по сообщению Wiwanitkit V., (603) и РИА VladNews со ссылкой на Информинг, в июле 2016 года в Китае «завозных» случаев лихорадки долины Рифт.

Разработка безопасных эффективных средств диагностики и изучение свойств вирусных белков с целью создания эффективных средств специфической профилактики требует применение высокоспецифичных иммунореагентов. Решение данных задач невозможно без МКА, полученных к отдельным белкам (или фрагментам), обладающих уникальными свойствами распознавать даже незначительные изменения в эпитопах вирусного антигена. Однако, получение отдельных вирусных белков или их фрагментов традиционными методами практически не возможно. Выходом из этой ситуации явилось применение рекомбинантных ДНК, несущих вставку генов целевых белков, и рекомбинантных аналогов иммунодоминантных вирусных белков. Также изучена перспективность применения рекомбинантных ДНК-конструкций и рекомбинантных белков с целью обеспечения стандартизации, безопасности, высокой

чувствительности и специфичности разрабатываемых тест-систем иммуноанализа.

Изучение иммунобиологических свойств ДНК-конструкций, несущих вставку генов иммунодоминантных белков NP и HA5 вируса ГП; NC, Gn, Gc вируса ЛДР, их рекомбинантных аналогов показало, что рекомбинантные белки, полученные *in vitro* в прокариотической системе, обладали антигенными свойствами. Они взаимодействовали с соответствующими специфическими антителами, присутствующими в сыворотках крови животных и иммуноасцитических жидкостях, полученных на соответствующий цельновирионный нативный вирус, и не вступали в реакцию с антителами к гетерологичным вирусам. Рекомбинантные белки и плазмиды обладали иммуногенными свойствами, индуцируя развитие обоих звеньев полноценного иммунитета. Индуцировали продукцию антител, специфично реагирующих с антигенными детерминантами нативного вирусного белка. Полученные нами результаты, согласуясь с данными Масаловой О.В., (37); Казачинской Е.И., (24); Самойлович М.П. (63); Панютин А.В. и др.(50); Разумова И.А. (58); Ризванова А.А. (59), J.van Vuren et al., (300); Paweska M. et al., (2007; 2008); Folgar et al., (371); Jackel P. (297), позволили использовать рекомбинантные белки и ДНК-конструкции в качестве иммуногенов и антигенов при совершенствовании технологии получения моноспецифических сывороток, моноклональных антител заданной узкой специфичности и при разработке диагностических тест-систем нового поколения.

Генетическая иммунизация доноров иммунных лимфоцитов обеспечила синтез высокого уровня антител к антигену, синтезируемому в естественных условиях, способствовала активированию В-лимфоцитов, что особенно важно при получении МКА, что позволило получить МКА в большинстве своем (58%) к конформационным эпитопам гликопротеина Gn вируса ЛДР; [13; 89; 93; 117; 202; 209; 228; 404] и согласуется с данными, полученными Jackel P. (298), C. Zhang C. et al., (591). Применение стратегии

гетерогенной прайм-бустерной иммунизации рекДНК→вирусные антигены; рекДНК→рекомбинантный белок позволило увеличить выход специфических клонов гибридом до 80-81% по сравнению с использованием в качестве иммуногенов очищенных антигенов вируса гриппа птиц; вируса ЛДР, где процент специфического клонообразования составлял не более 50%. Применение методов молекулярной биологии при совершенствовании отдельных этапов гибридомной технологии позволило в короткие сроки (2-3 месяца) получить стандартизованные МКА, направленные к конформационным эпитопам не только полноразмерного белка (гликопротеина G_п вируса ЛДР), но и к отдельному эпитопу белка (конформационный эпитоп белка р30) вируса АЧС [54; Приложения 12 и 17]. Полученные данные согласуются с результатами Масаловой О.В. и др. (37), которые в результате 4-5 кратной ДНК-иммунизации получили 90% выход специфических клонов гибридом; Казачинской Е.И. (24); Самойлович М. П. (63), Ризванова А.А. (59), использующих для иммунизации доноров спленоцитов рекомбинантные плазмиды, несущие вставку гена целевого белка. Результаты, полученные Панютин А.В. и др. (50); Ikegami T. et al. (292); Jakel et al. (297) показали, что иммунизация рекомбинантными белками, полученными даже в эукариотической системе экспрессии, предусматривающей его правильный фолдинг, обеспечила в итоге выход 10% клонов гибридом, продуцирующих МКА к конформационным эпитопам. Полученные МКА использованы в качестве иммунореагентов при конструировании тест-систем ИФА нового поколения для индикации вирусных антигенов и антител к ним.

Важнейшей составляющей борьбы с инфекционными болезнями является своевременная их диагностика. Сокращение времени проведения диагностических исследований особенно важно при обнаружении экзотических и карантинных болезней [30; 31; 84; 104; 147; 153; 234; 243; 254; 292].

В связи с широким применением живой вакцины и одновременной циркуляцией полевого вируса, диагностика методами флуоресцирующих антител и ИФА часто затруднена [147; 428; 429]. Наиболее перспективным, эффективным и специфичным является детекция фрагментов вирусного генома методами ОТ-ПЦР [4; 54; 62; 140; 216; 217]. Разработанные: двухраундовая ОТ-ПЦР в сочетании с рестрикционным анализом специфичных ампликонов; мультиплексная ОТ-ПЦР в режиме реального времени позволили в пробах вируссодержащего материала четко идентифицировать и дифференцировать эпизоотический и аттенуированные штаммы; выявлять геномы вирусов болезни Найроби и ЛДР, дифференцировать их между собой и другими представителями семейства *Bunyaviridae*. Однако кратковременная виремия (3-6 дней) при ЛДР, ограничивает применение методов ПЦР-диагностики болезни [142; 245; 353; 216; 605].

Особенность патогенеза ЛДР, гриппа А и болезни Ньюкасла обеспечила получение положительных результатов при разработке высокочувствительного иммуноцитохимического (ИЦХ) метода ИФА в культуре клеток на основе МКА, позволяющего выявлять антигенные детерминанты диагностически значимых белков указанных вирусов в клетках чувствительных линий уже через 8-12 часов после инфицирования, задолго до начала проявления выраженного ЦПД вируса. Разработанный ДАС ТФ ИФА на основе пар МКА к эпитопам нуклеопротеина ВГП и нуклеопротеина ВБН, полученных во ВНИИВВиМ [30; 87] обеспечивает одновременное выявление и дифференцирование в пробах вируссодержащего материала антигенов вируса гриппа птиц не зависимо от подтипа и антигенов вируса болезни Ньюкасла не зависимо от принадлежности к одному из известных пато- и генотипов второго класса. А также в пробах, содержащих смесь этих антигенов, что практически невозможно в РГА. Применение «Набора препаратов ...» на основе ДАС ТФ ИФА, при проведении мониторинговых исследований в период 2005-2012 гг.

(совместная работа с лаб. Индикации микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ; ФГБУ ЦНМВЛ Московская область) распространения вируса гриппа птиц и болезни Ньюкасла позволило выявить циркуляцию вируса болезни Ньюкасла и гриппа А, в том числе подтипов гриппа птиц H5 и H7 на территории Госкомплексов «Завидово» и «Таруса» в Центральном регионе РФ. Установлено, что антигены указанных вирусов могут быть выявлены не только в пробах паренхиматозных органов, но и в пробах носоглоточных и клоакальных смывов, что указывает на высокую вирулентность вирусов, циркулирующих среди диких птиц [375]. Также проведенные исследования показали, что определение пероксидазной метки с помощью усиленной хемилюминесценции позволяет в 10-50 раз повысить чувствительность метода ДАС ТФ ИФА при выявлении антигенов вирусов ГП и НБ. Что согласуется с результатами, полученными Терновой СФ. (77), Владимирова Ю.А. (12).

Использование стандартизованных рекомбинантных аналогов NP вируса ЛДР и вируса гриппа птиц, полученных в прокариотической системе экспрессии, и соответствующих МКА при разработке ТФ ИФА нового поколения для серодиагностики этих инфекций позволило, при снижении фонового уровня, увеличить чувствительность метода непрямого ТФ ИФА в 4 и более раз, дифференцировать вакцинированных и инфицированных животных. Подобные результаты, подтверждающие эти данные, получены при проведении мониторинговых исследований поствакцинального иммунитета птиц, привитых инактивированной вакциной против гриппа птиц H5. Установлено, что наличие высоких титров специфических антител в сыворотках крови свидетельствует о циркуляции вируса (в частности гриппа птиц и болезни Ньюкасла) в популяции диких животных. При проведении исследований установлено, что внепрямым ТФ ИФА на основе рекNP вируса гриппа птиц титр специфических антител в сыворотках крови инфицированных и переболевших животных в 4-8 раз превышает таковой привитых инактивированной вакциной (антигеном), что подтверждается

результатами, полученными Paweska J. (449; 450); J.vanVuren et al., (300; 301); Fafetine J. et al., (230); Kim H.J. (325). Так титры специфических антител к вирусу гриппа птиц H5 в сыворотках крови птиц, вакцинированных инактивированной вакциной, содержащихся на открытых выгульных площадках, где домашняя птица имела непосредственный контакт с дикой и синантропной птицей в 4-6 раз превышали общий титр популяции домашней птицы из хозяйств закрытого типа. Полученные результаты нашли свое подтверждение в работах Аканиной Д.С. и др. (2); Донник И.М. и др. (16); Донченко А.С. и др. (17); J.vanVuren et al. (301); Fukushi S. et al. (2012); Paweska J. Et al. (449; 450); McElroy A. et al. (393); Kortekaas J. et al. (331; 332), а также при проведении серологических мониторинговых исследований 2006-2009 гг. распространения гриппа птиц, болезни Ньюкасла среди дикой перелетной, оседлой и синантропной птицы на территории лесостепной области Алтайского края. Полученные результаты оказались сопоставимы с данными Алтайской краевой ветлаборатории по районам, неблагополучным по гриппу птиц и б. Ньюкасла [9]. Полученные результаты совпадали с результатами, полученными Weber F. et al. (600) и могут служить доказательством участия дикой перелетной, оседлой и синантропной птицы в возникновении, поддержании очагов инфекции и распространении вируса. Также в период 2008-2009 гг. отмечено увеличение до 59% выявления положительных сывороток к вирусу гриппа А от диких свиней, по сравнению с периодом 2005-2007 гг. (10-25%), что совпадает с динамикой повышения процента выявления серопозитивных проб во время проведения ежегодного мониторинга гриппа А среди свиней в этот период в Финляндии и Польше [384; 436]. Серологический анализ сывороток крови свиней показал доминирование в 2009-2010 гг. выявления антител к подтипу H1N1, нарастания динамики серопозитивности к H1N2 и H3N2, которые являются не безопасными для человека [68].

Таким образом, результаты серологического мониторинга показали, что по состоянию диких животных можно выявлять ранние признаки

приближения эпизоотий/эпидемий, что согласуется с данными Общества охраны дикой природы WCS- Wild life Conservation Society.

Анализ результатов опубликованных работ и определенные успехи в создании эффективной безопасной вакцины против ЛДР показал, что ни одна из кандидатных вакцин пока не отвечает либо требованиям безопасности [MP-12; cl-13], либо обеспечения стерильного протективного иммунитета [290; 334]. В разделе IV п.1.2. «Комплексной программы развития биотехнологии в РФ на период до 2020 года» [28] обозначена задача создания вакцин против инфекционных болезней состоящая в получении вирусного штамма, обладающего достаточной иммуногенностью, сниженной вирулентностью и генетической стабильностью. Использование вирулентного штамма для производства инактивированной вакцины в угрожаемых зонах, как это происходит в эндемичных по ЛДР зонах Африки, не безопасно как в плане производства, так и применения. К тому же для профилактики ЛДР в этих районах эксперты МЭБ не рекомендует применение живых аттенуированных вакцин [504; 618; 619; 49]

Проведенные экспериментальные исследования показали целесообразность использования аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» в качестве производственного для разработки технологии изготовления безопасной эффективной инактивированной вакцины против ЛДР, так как по своим молекулярно-биологическим свойствам штамм отвечает требованиям МЭБ, предъявляемым к производственному штамму для изготовления инактивированных вакцин против ЛДР. Вирус накапливается в культурах перевиваемых линий в высоких титрах инфекционной и антигенной активности, безвреден, обладает антигенностью и иммуногенностью для животных при парентеральном введении. Имеет наименьшие изменения в гене, кодирующем гликопротеины Gn/Gc М-сегмента, по сравнению со штаммом «Smithburn's» и MP-12. Синонимичные единичные замены в нуклеотидной последовательности *gn/gc*-генов не затрагивают антигенные эпитопы, индуцирующие синтез

вируснейтрализующих антител. Так как сывороточные антитела, полученные к Gn/Gc в результате ДНК иммунизации обладали вируснейтрализующими свойствами, с титром в РН 1:64-128, подтверждая, что оболочечные белки Gn/Gc ответственны за синтез ВН антител [160; 430; 479; 489; 515; 516]. Наличие уникальной замены глутаминовой кислоты на глицин (E→G) в положении 159 *n*-гена S-сегмента и отсутствие сайтов рестрикции PstI и PaeI на участке *nss*-гена S-сегмента могут служить генетическим маркером отечественного штамма в перспективе производства и применения вакцин против ЛДР [205].

Результаты подбора чувствительной лабораторной модели согласуются с данными, полученными Tomori O., Kasari T.R. et al. (572) Smith D.R. et al. (529), Morrill J.C. et al. (411; 412), также показавшие, что аутбредные белые мыши различных возрастов, обеспечивают наиболее стабильные результаты, в отличие от золотистых и сирийских хомячков [149; 215; 292; 529]. Патогенез болезни и патологоанатомические изменения при заражении вирулентным штаммом ЛДР мышей сходны с таковыми у овец (ягнят) до 6 месячного возраста; при изучении нейротропных свойств штамма наиболее характерные клинические признаки и изменения в ЦНС отмечены также у белых мышей. На основе проведенных исследований изучения иммунобиологических свойств штамма «1974-ВНИИВВиМ» отобраны перmissive перевиваемые культуры клеток (культуры клеток ВНК-21/13; ПС), режимы метод культивирования (34°C; 72 часа, роллерный метод), обеспечивающие максимальное накопление инфекционной и антигенной активности вируса; подобраны оптимальные: конечная концентрация инактиванта(теотропин (А-24) 0,1%), который является более безопасным соединением, нежели димерэтиленамина [25; 61;] и режим инаktivации, обеспечивающие максимальное сохранение антигенных свойств вируса.

Установлена прямая зависимость титра антигемагглютининов, уровня защиты животных против вирулентного вируса от исходной концентрации гемагглютининов и инфекционной активности вирусного сырья

(коэффициент корреляции, соответственно, 0,89 и 0,97 $p \leq 0,05$). Данный критерий антигенности выбран в связи с тем, что гликопротеины вируса ЛДР [138; 142; 249], ответственны за выработку антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами, обеспечивая в дальнейшем протективные свойства вакцинного препарата.

Полученные результаты согласуются с данными R. Swanepoel et al. (556; 558); Jackel et al. (297), показавшими, что результаты ТФ ИФА коррелируют с данными исследования иммуногенной активности препаратов вакцины, а также с данными Paweska (449; 450); J. vanVuren (300; 301); Jackel S. et al. (297); Fukushi S.; Fafetine J. et al. (230) об использовании ТФ ИФА на основе МКА (олигоклональных) специфичных не только к нуклеопротеину, но и к гликопротеинам вируса для оценки концентрации вирусного антигена и определения ответа вакцинированных животных на введение вакцины. Преимущество применения МКА в ТФ ИФА обуславливается тем, что они объективно оценивают конформационную структуру иммуногенных эпитопов гликопротеина вакцинного вируса, в то время как поликлональные антитела выявляют суммарную антигенность препарата, а не истинное содержание гликопротеина, тем самым завышая антигенность вакцин [1; 81; 343].

Определение антигенных и иммуногенных свойств разрабатываемых вакцин против ЛДР на с-х животных сопряжено с высоким риском заражения персонала и экономически не целесообразно. Поэтому для определения указанных свойств вакцинных препаратов подобрана лабораторная модель – аутбредные белые мыши массой 20-25 г. Результаты исследования согласуются с данными, полученными Peters C. и Linthicum K., (457); Flick R., (235); Lorenzo G. et al., (371; 372); P.J. vanVuren, et al., (300); Dodd K. A. et al., (210; 211) также показавшими, что изучение иммунного ответа на белых мышах коррелирует с результатами, полученными на овцах. Предлагаемый метод предварительной оценки свойств вакцинных препаратов с использованием мышей в качестве лабораторной модели

существенно снижает затраты при разработке и производстве вакцин и позволяет, вследствие его доступности, проводить контроль на любой стадии изготовления препарата [215; 235; 344; 370; 371; 446; 491].

Изучение иммунного ответа, в том числе протективного при иммунизации инактивированным антигеном вируса ЛДР из аттенуированного штамма, показало, что специфические антитела на детектируемом уровне могут быть выявлены, начиная с 10-14 дней после первого введения и достигают своего максимума при повторном введении к 28-30 суткам после первого введения. На этом уровне титры антител сохраняли свои значения до 60 суток (срок наблюдения). Устойчивость вакцинированных животных к контрольному заражению вирулентным штаммом «Энтеббе» составила 80-90% при 100% гибели контрольных животных. Полученные результаты согласуются данными Niklasson B. (429); Pittman P.R. et al. (463); Plotkin L.S. et al. (464); Folgar V. et al. (371; 372), которые определили, что протективный уровень ВН АТ составляет 1:16-1:20 и более. Способ оценки иммуногенности вакцины по протективным свойствам сыворотки крови вакцинированных животных довольно точен и позволяет в короткий срок предварительно оценить иммуногенность вакцины.

Экзотичность ЛДР для нашей страны, ее особенность внезапного появления ЛДР в благополучных районах, угроза проведения биотеррористического акта [376; 184; 235; 161] обуславливают необходимость разработки вакцин и стратегий вакцинации, обеспечивающих раннюю быструю защиту от патогена, путем активации системы врожденного и развития адаптивного иммунного ответа. Альтернативой традиционным вакцинам являются рекомбинантные и ДНК-вакцины, основанные на использовании отдельных иммунодоминантных белков патогена [165; 179; 199; 205; 244; 437].

Наибольшую поддержку в мире в настоящее время находит стратегия вакцинации гетерогенной «prime-boost» иммунизации -

инициация→усиление [13; 32; 39; 124; 282; 314; 372; 374; 392; 407; 470]. Порядок введения различных типов вакцин может модулировать определенный иммунный ответ [74].

Учитывая данные, что рекомбинантная ДНК оказывает воздействие на иммунную систему подобно живой вакцине, но без инициации инфекции [607; 608; 564; 565], нами на лабораторной модели (аутбредные белые мыши, мыши линии BALB/c) изучено воздействие эффекта праймирования рекомбинантной ДНК на иммунологическую эффективность инактивированного антигена, изучены иммуногенные свойства рекомбинантных плазмид, несущих вставку полноразмерного гена гликопротеинов G_n, G_c вируса ЛДР; способность микрогранул и микрокапсул на основе альгенат-поли-L-лизина защищать вводимую ДНК от воздействия клеточных нуклеаз и одновременно выполнять роль адъюванта. Проведены исследования по разработке стратегии гомологичной и гетерологичной прайм-бустерной иммунизации против гриппа птиц подтипа H5 и ЛДР; анализу гуморального и клеточного иммунного ответа. Полученные результаты показали, что в течение 3-5 суток после ДНК-иммунизации отмечена активация клеток моноцитарно/макрофагальной системы, а также активация и пролиферация В-лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов. Тогда как Anziliero D. с соавторами, (112) подобный эффект выявляли только к 7 суткам. Результаты исследования цитокинового профиля показали, что вводимые препараты рекомбинантных плазмид активируют транскрипцию различных цитокинов, способствуя регуляции механизмов клеточного и гуморального иммунитета, что согласуется с данными Donnelly J. et al., (213); Liu Y. et al., (363; 365); Belakova J. et al., (130); Lorenzo G. et al., (371; 372); Neefjes J. et al., (423); Bird B. et al., (144); Anziliero D., (112). Подтверждают данные Fodor I. et al., (236); Wolff J.A. et al., (607; 608); McConkey S.J. et al., (392); Bower J.F. et al., (163); Wallace D.B. et al., (595); Liu M.A. et al., (363; 365); Kutzler M.A. et al., (338); Lorenzo G., (371; 372), что рекомбинантная плазида после введения в

организм реципиента инициирует каскад реакций врожденного и адаптивного клеточного и гуморального иммунного ответа – активацию нейтрофилов, фагоцитарную активность макрофагов, индукцию интерферонов 1 типа, провоспалительных цитокинов. Это обеспечивается экспрессией генов и синтезом рекомбинантных белков *in vivo* после введения ДНК-конструкций, наличием PAMPs: двухцепочечной ДНК плазмиды, CpG ODN в составе плазмиды и синтетического CpG мотива, которые, соответственно, через каскад STING/TBK1/IRF3 и Toll-подобные рецепторы-9 (TLR-9) активируют индукцию врожденного иммунитета, в том числе синтез ИФН 1 типа [327;407; 542; 318; 373; 555].

Полученные результаты, согласуются с данными других исследователей Masalova O.V., (37); Papin J. et al., (446); Armengol G. et al., (115) и показали, что динамика продукции антител при ДНК-иммунизации принципиально отличается от сероконверсии при стандартной схеме иммунизации вирусным антигеном. Установлено, что ответ на ДНК-иммунизацию характеризуется небольшим постепенным повышением уровня АТ к 21 суткам после первой инъекции, вторая инъекция рекомбинантной ДНК также не привела к значительному увеличению титра АТ. К 28-30 суткам, при однократном введении ДНК, титр антител снижается до уровня фона и претерпевает значительный подъем к 14 суткам при условии продолжения инъекций рекДНК. Результаты подтверждаются данными, полученными О.В.Чубуковой и др., (83) и О.В. Масаловой и др., (37), получивших подобную картину гуморального ответа к капсидному белку вируса гепатита С NS5A. После третьей иммунизации также как и Chen Su-Juan et al., (181), наблюдали значительное повышение титра специфических антител. У контрольных животных, иммунизированных исходным плазмидным вектором pcDNA-3, подобной динамики не наблюдали. Полученные нами данные ДНК-иммунизации согласуются с данными Kasinrer W. et al., (314), что при в/м и в/к введении ДНК сохраняется в течение 56-70 дней, о чем свидетельствуют результаты ИГХ биопсии мышц

(место введения) и ОТ ПЦР. Результаты РТ ОТ ПЦР, полученные О.В. Чубуковой и др., (83); Orsag P. et al. (440); Мухамедхановым Н.Х. (41) показали, что рекомбинантная плазида рсDNA-3S присутствовала в мышечной ткани иммунизированных животных, по крайней мере, в течение 20-30 суток после инъекции. Таким образом, сведения о сохранении вводимой ДНК весьма разноречивы - от 17-20 дней [5; 406; 407] до 2 лет [115] и требуют дальнейшего изучения.

Полученные нами результаты сравнительного изучения на лабораторной модели эффективности различных типов вакцин показали, что праймирование рекДНК вызывало развитие раннего клеточного и гуморального ответа (3-7 суток). Также как и живая вакцина, ДНК-иммунизация обеспечивала к 5-7 дням после инъекции синтез специфических антител, в том числе ВН, в то время как инактивированная вакцина индуцировала такой же уровень антител только к 14 суткам после введения препарата. Введение ДНК с генетическим адъювантом CpG ОДН в составе биodeградируемых микрогранул и микрокапсул имело преимущества перед введением ДНК-конструкций на физиологическом растворе, заключающиеся в активации и пролиферации CD8+, CD4 Т-лимфоцитов и CD20 В-лимфоцитов и повышении уровня антител, в том числе ВН.

Гомологичная ДНК/ДНК и гетерологичная стратегии прайм-бустерной иммунизации ДНК/рекомбинантный белок; ДНК/инактивированная вакцина показали сопоставимые результаты индукции синтеза специфических антител, в том числе ВН, однако лучший эффект обеспечивала гетерологичная стратегия. Показано, что праймирование иммунной системы рекомбинантной ДНК обеспечивает при последующем (через 14-21 день) введении ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР усиление ответа обоих звеньев иммунитета и 97-98% защиту привитых животных. Полученные результаты согласуются с данными, полученными Lodmell D. et al., (367); 433; Often G. et al., (437); Barnett S.G. et al., (124); Kongkasuriychai D.L. et al., (329).

Полученные результаты изучения цитокинового профиля показали, что через 3 суток после введения практически всех типов вакцин отмечена активация экспрессии генов цитокинов первого поколения - интерферона- α (ИНФ- α), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α). ИНФ- α продуцируемый активированными макрофагами, мононуклеарными фагоцитами, играет важную роль в инициации иммунного ответа, опосредованного Т-лимфоцитами путем прямой активации CD4 или CD8 Т-лимфоцитов, он также усиливает литическое действие НК. Индуцирует экспрессию антигенов МНС I класса и подавляет экспрессию тех же антигенов МНС II класса.

Активированные макрофаги секретируют ИЛ-12, который действует как ростовой фактор при активации Т-клеток, нормальных киллеров (НК-клеток) и опосредует переход Th0 в Th1-клетки.

На 7сутки после введения рекомбинантных плазмид отмечен биосинтез центрального регуляторного цитокина ИЛ-2 и, регулирующего воспалительные реакции ИФН- γ , который усиливает экспрессию молекул МНС I и II класса на макрофагах, моноцитах, дендритных клетках и поддерживает баланс Th1/Th2. В этот период отмечена активация экспрессии генов интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), который, являясь многофункциональным цитокином, активирует каскадный характер цитокинового контроля иммунного ответа.

На 10 сутки все виды вакцин продуцировали ИЛ-1 β , ИНФ- α и ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-10. ИЛ-6 является фактором дифференцировки В-клеток, способствует их созреванию в плазматические клетки и индуцирует биосинтез ИЛ-2. Интерлейкины 4 и 10 принимают участие в регуляции баланса Th1/Th2, обладают синергизмом в подавлении клеточного иммунитета. ИЛ-4 направляет дифференцировку Th0 в Th2 и широко используется как маркер при идентификации Th2-клеток.

Таким образом наличие экспрессии ИЛ-2, ИНФ- α , ФНО- α и ИФН- γ и ИЛ-1 β свидетельствовало о функциональной активности иммунитета Th1-

типа в первые 3-7 суток, а экспрессии ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 - о функциональной активности иммунитета Th2-типа на 7-10 сутки.

Инактивированный антиген, введенный через 14 суток после ДНК праймирования вызывал повышение синтеза ВН антител в 4 и более раз, достигающего максимума к 28-30 суткам после введения (14 дней после второй иммунизации). Более высокие титры антител отмечали в группе с одновременным введением рекомбинантной плазмиды генетического адьюванта CpG ОДН в составе биосовместимых гранул.

Установлено, что для достижения напряженного протективного иммунитета в результате ДНК-иммунизации требуется ее многократное (3-5 раз) введение, что согласуется с данными Donnelly J.J. et al., (213); Митрофановой Е.Э. и др., (42); Супотницкого М.В., (74). Однако этот факт не желателен при проведении компании вакцинации восприимчивого поголовья скота, к тому же при многократном введении антигена повышается аффинность синтезируемых антител, но снижается их олигоклональность, также не исключена возможность развития эффекта толерантности.

Как показали результаты исследования на мышах, применение стратегии гетерологичной прайм-бустерной иммунизации ДНК→ГОА-сорбированный инактивированный антиген обеспечило развитие раннего клеточного и гуморального иммунного ответа, в том числе протективного. В медицинской практике также показано усиление иммунного ответа при комбинированном одновременном введении рекомбинантной ДНК, кодирующей гликопротеин и 1/25 иммунизирующей дозы инактивированной вакцины против бешенства [124].

Преимущество ДНК-иммунизации заключается в том, что рекДНК стимулирует синтез интерферонов первого поколения, препятствующих репликации вирусной РНК и, соответственно, размножению вируса; синтез высокоавидных специфических антител. Учитывая консерватизм гликопротеина Gn [202; 204], гомологию штамма «1974-ВНИИВВиМ» и вирулентного штамма Энтеббе по *gn*-гену, составляющую 99% [62; 23],

отсутствие делеций и замен нуклеотидной последовательности эпитопов, индуцирующих синтез вируснейтрализующих антител, использование инаktivированного цельновирioнного антигена из штамма «1974-ВНИИВВиМ» в качестве бустерной дозы обеспечивает ответ на более широкий и полный спектр антигенных детерминант вируса и достижение сбалансированного полноценного иммунного ответа против ЛДР, что позволит в последствии, в случае заражения вирулентным вирусом, избежать развитие феноменов антигенного импринтинга и антительного усиления инфекции [74; 112; 210; 243].

Успех применения гетерологичной прайм-бустерной иммунизации ДНК/инаktivированный антиген обусловлен ранней (6-12 часов после введения) экспрессией интерферонов ИФН- α/β 1 типа, увеличением активности макрофагов, экспрессией провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантов [367; 260], которые сохраняются в течение 7-10 суток (срок наблюдения). В данном случае возможно также применение стратегии DIVA-анализа с применением непрямого или конкурентного ТФ ИФА на основе рекомбинантного нуклеопротеина вируса ЛДР и соответствующих МКА.

Дальнейшее корректирование этой стратегии вакцинации на целевых сельскохозяйственных животных приведет к разработке стратегии вакцинации, обеспечивающей полную защиту животных от заражения и размножения вирулентного вируса ЛДР. К тому же преимуществом ДНК-иммунизации является способность трансфецировать клетки без интерференции с вирусными антигенами, эффективность в присутствии материнских антител (колострального иммунитета) [130; 469], что позволит в случае возникновения угрозы появления ЛДР проводить вакцинацию восприимчивых животных всех возрастов и физиологического состояния.

6. Выводы

1. На основе применения молекулярно-биологических методов разработаны средства и методы ранней диагностики ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла; стратегий прайм-бустерной иммунизации с использованием ДНК-конструкций, кодирующих гликопротеины вируса ЛДР, рекомбинантных белков и инаktivированного антигена из аттенуированного штамма, обеспечивающих развитие раннего иммунитета у привитых животных.

2. Антигенные и иммуногенные свойства рекомбинантных белков Gn/Gc, NC вируса ЛДР, NP вируса гриппа птиц, полученных в прокариотической системе экспрессии и рекомбинантных ДНК, позволяют использовать их, соответственно, в качестве антигенов при конструировании тест-систем иммуноанализа нового поколения и иммуногенов при получении моноспецифических сывороток и моноклональных антител.

3. Усовершенствованы ключевые этапы гибридомной технологии, позволяющие повысить выход положительных клонов гибридом с 27-44% до 74-80%; сократить время получения с 6 до 2-3 месяцев стандартизованных МКА к генетически охарактеризованному полипептиду; способных выявлять антигенные детерминанты вирусных белков и их рекомбинантных аналогов.

4. Разработаны методы ранней диагностики ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов (гриппа птиц H5N1; ЛДР) и различные форматы ИФА (ЛДР, гриппа птиц и болезни Ньюкасла), обеспечивающие надежное выявление в образцах инфицированного материала, соответственно, РНК вируса и антигенные детерминанты вирусных белков; позволяющие дифференцировать штаммы/изоляты по вирулентности и от других вирусов, представителей соответствующих семейств.

5. Для ретроспективной диагностики и серологического мониторинга предложены различные форматы ТФ ИФА на основе МКА к нуклеопротеину вирусов ГП, НБ, ЛДР; непрямой вариант ТФ ИФА на основе рекомбинантного белка нуклеопротеина вируса ЛДР и МКА. Использование в качестве специфического антигена рекомбинантного белка обеспечивает безопасность метода, повышение специфичности и чувствительности метода в 4-8 раз по сравнению с использованием инаktivированного очищенного вирусного антигена.

6. На основании результатов изучения молекулярно-биологических свойств штаммов вируса ЛДР, имеющих в коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, для изготовления инаktivированных вакцин против ЛДР рекомендован штамм «1974-ВНИИВВиМ», отвечающий требованиям МЭБ. Штамм стабилен, накапливается в чувствительной культуре клеток в пределах 7,0-7,5 lg ТЦД_{50/см3}; активность РНГА - 256-512 ГАЕ; безвреден при парентеральном введении животным; индуцирует синтез вируснейтрализующих, антигемагглютинирующих и комплементсвязывающих антител. Отсутствие сайтов рестрикции PstI и PaeI в *nss*-гене, характерных для других аттенуированных штаммов; наличие уникальной аминокислотной замены в положении 159 E→G могут служить генетическим маркером отечественного штамма при применении вакцин против ЛДР.

7. На лабораторной модели – аутбредные белые мыши - установлено, что минимальная иммунизирующая доза инаktivированного антигена вируса ЛДР, обеспечивающая 50% защиту лабораторных животных от заражения вирулентным вирусом штамм «Энтеббе», составляет 64 ГАЕ. Препараты, не вызывающие гибели 1-3 суточных мышей после внутримозгового заражения, индуцирующие синтез вируснейтрализующих антител в пределах 1:32 и выше, обеспечивают 80-90% защиту привитых животных от гибели.

8. Подтверждено на лабораторной модели, что ДНК-конструкция, несущая вставку генов гликопротеинов вируса ЛДР в первые 3-7 суток после введения индуцирует активацию и пролиферацию клеток моноцитарно/макрофагальной системы и иммунокомпетентных клеток; продукцию провоспалительных, и регуляторных цитокинов, специфических антител к синтезируемым *in vivo* гибридным белкам.

9. Установлено, что праймирование рекомбинантными плазмидами pCI-neoGn/pCI-neoGc заключенные в биосовместимые биodeградируемые микрогранулы (микрокапсулы) обеспечивает раннее развитие в организме привитых животных клеточного и гуморального иммунного ответа, начиная с 3-7 суток (в РН 1:8-16; РЗНГА – 1:64-128) и его 4-8-кратное усиление после введения на 14 день ГОА-сорбированного инактивированного антигена вируса ЛДР (РН – 1:64-128; РЗНГА – 1:512-1024).

10. На примере ЛДР разработана «Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения ЛДР», позволяющая в рамках данных среднесрочного прогнозирования, использования библиотеки генов иммунодоминантных белков вируса в кратчайшие сроки (4-6 месяцев) развернуть производство реагентов для конструирования тест-систем ранней диагностики и средств иммунизации, обеспечивающих, соответственно, своевременное выявление патогена (24 часа) и раннюю защиту (3-7 суток) восприимчивых животных от заражения вирулентным вирусом.

7. Практические предложения

Способ получения МКА узкой направленности, на основе применения рекДНК и соответствующих рекомбинантных белков, позволит получить МКА к отдельным иммунодоминантным вирусным белкам, (или их фрагментам), которые могут быть использованы в качестве иммунореагентов для конструирования тест-систем ИФА и исследовательских целей.

Разработанные методы ТФ ИФА для выявления антигенов вирусов и специфических антител к ним в совокупности с методами генодиагностики могут быть использованы для ранней диагностики и мониторинговых исследований распространения изучаемых болезней.

Предложенная двухраундовая ОТ ПЦР с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов позволит при производстве вакцин против ЛДР проводить контроль генетической стабильности вакцинного штамма, а также в случае возникновения ЛДР дифференцировать вакцинные и эпизоотические штаммы.

Применение «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла» позволяет идентифицировать в пробах инфицированного материала антигены вируса и одновременно дифференцировать грипп птиц и б. Ньюкасла независимо от принадлежности к определенному подтипу, пато- и генотипу соответствующего вируса.

ГОА-сорбированный инактивированный антиген вируса ЛДР из аттенуированного штамма «1974-ВНИИВВиМ» и стратегия гетерологичной прайм-бустерной иммунизации рекДНК_{Gn/Gc}→ГОА-сорбированный инактивированный антиген вируса могут быть использованы для профилактики заражения и распространения ЛДР в угрожаемых зонах и осуществления DIVA концепции.

Предложенная схема (на примере ЛДР) сочетания данных прогнозирования, вспышек ЛДР, библиотеки генов иммунодоминантных белков вируса позволит в кратчайшие сроки развернуть производство

средств ранней диагностики, профилактики на основе применения ДНК-конструкций, рекомбинантных белков и инаktivированного антигена вируса. Мероприятия, реализуемые в соответствии с предлагаемой схемой призваны обеспечить эпизоотическую и в конечном счете биологическую безопасность РФ.

9. Список используемой литературы

1. Абелев Г.И. Моноклональные антитела//Соровский Образовательный журнал.- 1998.-№1.-С.1-20.
2. Аканина Д.С. Разработка средств диагностики высоковирулентных штаммов вируса гриппа А подтипа H5N1: автореф. дис... канд. биол. наук -М, 2014.-27с.
3. Балышева В.И. Перспективы биоинкасулирования в ветеринарии.// Ветеринарный врач.-2009.-№4.-С.22-25.
4. Белов А.В. Молекулярно-биологическая и вирусологическая характеристика вируса ЛДР и создание тест-систем для диагностики этой инфекции: автореф. дис.... канд. биол. наук / Белов Артем Владимирович. - М, 2007.-27с.
5. Белов С.Ю. Разработка доставки генетического материала с использованием микросфер: автореф.дис.... канд. биол. наук/Белов Сергей Юрьевич. - Покров, 2011.-31с.
6. Березкина Г.В., Никитюк П.М., Филимонова И.Н., Опочинский Э.Ф. Диагностическая эффективность листериозного эритроцитарного антигенного диагностикума//ЖМЭИ.-1992.- №.6.- С. 93-94.
- 7 . Бровкина А.Н. Разработка метода и тест-системы выявления бактерий рода *Salmonella* на основе латексаагглютинации//Научн. журнал КубГАу.-2011.-№72(08).- С.1-9. Режим доступа: <http://ej.KubGao.ru/2011/08/pdf/31/pdf>
8. Бобылов Ю.А. Накануне глобальной мировой биологической войны//Качественная клиническая практика.-2012.- №1.- С. 56-64.
9. Бондарев А.Ю. Мониторинг инфекционных болезней диких птиц в лесостепной области Алтайского края: автореф. дис.... канд. вет. наук – Барнаул, 2010.-247с.
10. Браун Дж., Линг Н.Р. Моноклональные антитела мыши//. Кэтти Д. Антитела. Методы. Кн.1.-М.: Мир, 1991.-117с.
11. Бывалов А.А, Еланин Г.Д., Печенкин Д.В. Диагностикум псевдотуберкулезный эритроцитарный моноклональный//Патент на изобретение № 2008120443/13, опубл.27.12.2009.
12. Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминисценция и биолюминисценция как инструмент в медико-биологических исследованиях.//Биология. Соровский образовательный журнал.- 2001.-Т.7,№1.-С.249-257.
13. Гордон Ада Вакцины и вакцинация//Международ. медицинский журнал..-2002.- №1. Режим доступа: <http://medi.ru/doc/7720111.htm>
14. Ганнушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Ae.aegypti* и *Ae. albopictus* Skus – новая биологическая угроза для юга России.//Медицинская паразитология и паразитарные. болезни.-2012.- №3.-С.49-54.
15. Джавадов Э. Д. Грипп птиц. Стратегия противодействия /Э. Д. Джавадов и др.// Ветеринария. - 2006. - №6. - С. 3-6
16. Донник И.М., Шилова Е.Н. Динамика напряженности поствакцинального иммунитета у экспериментальной птицы при гриппе А//Ветеринария Кубани.- 2009.-№3.-С.35-38.

17. Донченко А.С. Силко Н.Ю., Глущенко А.В., Шестопалов Л.В., Корчагина К.В. Характеристика вируса болезни Ньюкасла, выделенных в России от мигрирующих птиц // Сибирский Вестник с-х наук.-2013.-№1.-С.60-67.
18. Ездакова И.Ю. Идентификация и характеристика биологических свойств белков суперсемейства иммуноглобулинов животных: автореф дис.... докт. биол. наук / Ездакова Ирина Юрьевна. - Москва, 2012. - 52 с.
19. Егоров А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа./А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев.-М.-1991.-288с.
20. Жигалева О.Н. Перспектива создания диагностических наборов нового поколения на основе генно-инженерных технологий./ О.Н.Жигалева, Власова Н.Н., Новиков Б.В., Цыбанов С.Ж.//Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. науч. конф.- Ульяновск, 2006. -С.39-42.
21. Жиангерова О.В. Дифференциация гемагглютинитинов Н5 и Н7 вируса гриппа А птиц на основе МКА/ Ольга Васильевна Жиангерова: автореф. дис. канд. биол. наук - Покров, 2009.-25с.
22. Журавлева В.А. Моделирование и оценка риска распространения ньюкаслской болезни/ Валентина Алексеевна Журавлев: автореф, дис....канд. биол. наук - Покров, 2009.-28с.
23. Иматдинов И.Р. Конструирование и клонирование искусственных генов, кодирующих иммунодоминантные белки вируса ЛДР и их характеристика: дисс.... канд. биол. наук - Покров, 2014.-125с.
24. Казачинская Е.И. Получение и применение МКА и рекомбинантных белков для иммунодиагностики инфекций человека: автореф. дис. док-ра. биол. наук- М., 2010.-45с.
25. Кандыбаева Ж.Б., Хайрулин Б.М. Сравнительное изучение инактивации вируса Ауески димером этиленimina и формальдегидом//Вестник науки КазАТУ им. С Сейфулина.-2011.-№4(71).-С.1-7.
26. Киселев А.В., Куприянов В.В. Антигенные и иммуногенные свойства аффинноочищенных белков вируса АЧС// Тез. докл. научн. конф. ВНИИВВиМ. - 1991.-Т.3.-С.465-467.
27. Колосова М.В., Вишняков И.Ф., Середа А.Д. Моноклональные антитела к нуклеокапсидному белку вируса ЛДР//Диагностика, профил., и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: материалы Междунар. науч.-практич. конф. . ВНИИВВиМ.- Покров, 2000.-С.150-152
28. Комплексная программа развития биотехнологий РФ на период до 2020 г.: решения Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям . от 1.04.2011 г. (прот№2, разд.1, п.1)
29. Кузнецов В.В., Евдокимов А. А., Сметанникова Н. А., Нетесова Н. А. Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации рнк вируса лихорадки долины рифт методом от пцр в реальном

времени (RU 2552795):C12Q1/68 - использующие нуклеиновые кислоты ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" (RU)

30. Лазарева Л.Н., Митин Н.И., Черных Н.А. Получение гибридом и моноклональных антител к антигенам парамиксовирусов.//Тез .науч. конф. ВНИИВВиМ, посвящ. 30-летию института.- Покров,1988.-т.2.-С. 169-172
31. Ларичев В.Ф. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации /В.Ф. Ларичев, М.А. Сайфуллин, Ю.А. Акиншина, Н.В. Хуторецкая, А.М.Бутенко//Эпидемиология и инфекционные болезни, 2012.-N 1.-С.35-38.
32. Логунов, Д. Ю. Молекулярно-генетические технологии защиты от патогенов/Д. Ю. Логунов, Б. С.Народицкий, А. Л. Гинцбург//Ремедиум. 2008. - N 2. - С. 14-19.
33. Львов Д.К. Новые и возвращающиеся инфекции – дремлющий вулкан.//Проблемы особо опасных инфекций. -2008.-2(96).-С.5-8
34. Литвинова Л.С. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов/Л.С.Литвинова, Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г. и др. //Медицинская иммунология. -2014.-16(1).-С. 35-41.
35. Мак-Керн Т.Д. Клонирование гибридомных клеток путем лимитирующего разведения в жидкой фазе // Моноклональные антитела, Гибридомы: новый уровень биологического анализа.-М.: Медицина, 1983. 374 с.
36. Манько В.М. МКА: иммунобиотехнологические принципы получения и перспективы их применения.//Гематология и трансфузиология.-1990.-№4.-С.4-10
37. Масалова О.В.ДНК-иммунизация плазмидой, содержащей ген белка NS5A вируса гепатита С, индуцирует эффективный клеточный иммунный ответ/ О.В.Масалова, Е.И. Леснова, В.В. Грабовецкий, и др.//Молекулярная биология .- 2010.-44.-№2.-С.125-130.
38. Марков Е.Ю. Структура и адъювантные свойства CrGODN// Медицинская иммунология. -2010.-6.-С.469-476.
39. Манзенюк И.Н., Шипулин Г.А., Алексеева Ю.А., Браславская С.И., Сперанская А.С., Чеканова Т.А. и др. Разработка иммуночипа для раздельной детекции антител к вирусу гепатита С. Клиническая лабораторная диагностика.-2008.-№6:-С. 25-30.
40. Медуницын Н.В., Покровский В.И. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней: учебное пособие.-М.,2005.-528с.
41. Мухаметханов Н.Х. Анализ структуры и получение в прокариотической системе рекомбинантного белка G2 хантавируса серотипа пуумала, изолированного из зоонозного очага на территории республики Башкортостан: автореф. канд....биол.наук-Уфа, 2010.-23с.
42. Митрофанова Е.Э. Генная иммунизация против вируса клещевого энцефалита/Е.Э. Митрофанова, В.Н. Бахвалова, Е.Ю. Добрикова и др. // Молекулярная биология. – 1997. – Т. 31. – С. 403–406
43. Мониторинг гриппа А у диких птиц / О. Н. Пугачев и др.// Ветеринария. - 2009. - №4. - С. 23-25

44. Найхин, А. Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация/А. Н. Найхин//Вопросы вирусологии. - 2012. - Т. 57, № 3. - С. 4-9
45. Новости ВОЗ о вспышках болезней/ WHO, 2014. Режим доступа. <http://www.paho.org/world-helth-day-2014/>
46. Новые трансмиссивные вирусные болезни (Vmerge) /Отдел животноводства и ветеринарии ФАО, 2013. Режим доступа. <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/ru/Vmerga/html>
47. Онищенко Г.Г. Обеспечение биологической, химической и радиационной безопасности при террористических актах./Г.Г. Онищенко; А.А., Шапашников; В.Г., Субботин Г.П. -М., 2005.-431с.
48. Онищенко Г.Г. Биотерроризм. Национальная и глобальная угроза/ Г.Г. Онищенко, Л.С. Сандахчиев М.С., Нетесов //Вестник РАН.-2003.-23(3).-С.195-204.
49. Орлов А.А. Разработка культуральной вирусвакцины против ньюкаслской болезни: автореф. дис...канд. вет. наук.-Покров, 2004.-25с.
50. Патент №1733470 А1 Способ получения гибридом, продуцирующих МКА к рекомбинантным белкам/Панютин А.В., Шидловская Е.А., Войтенко Н.И., Праслова В.Л., Чумаков П.М., Резников М.В.; опублик.15.05.1992, Бюл.№18
51. Патент №2123337 препарат «Теотропин» для дезинфекции объектов санитарного надзора/Зубаиров М.М., Миколайчук С.В., Рудобельский Э.В., Лагуткин Н.А. и др. опублик. 20.12.98 г.
52. Пантюшенко М.С., Смирнов В.Н., Орлов А.А., Жигалева О.Н Дифференциация вируса болезни Ньюкасла методом рестрикционного анализа ПЦР-продуктов//Материалы науч.-практич. конф., посвящ. 45-летию ВНИИВВиМ, 2003.-Ч.2.-С.457-460.
53. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения// М:FEOTAP Медиа, 2011.-608с.
54. Першин А.С. Совершенствование способа получения МКА к структурному белку р30 вируса АЧС с использованием рекомбинантных конструкций: дис.... канд. вет. наук: 06.02.02/Першин Андрей Сеогеевич.- Покров, 2013.- 122 с.
55. Пиря А.А., Устин А.В., Колонцов А.А., Митин Н.И., Реутова Е.Г., Макаров В.В./Получение и характеристика моноклональных антител к полипептидам АЧС// Тез. докл. науч. конф. ВНИИВВиМ. – Покров, 1991.-т.3.- С.502-505
56. Плеханова М.В.,Талаев В.Ю., Бабайкина О.Н., Заиченко И.Е., Ефимов Е.И. Действие вакцин против гепатита В на фенотипические и функциональные свойства дендритных клеток новорожденных *in vitro*//Иммунологическая репродукция.-2012.-№6.-С.311-318.
57. Попов И.О., Титькина С.Н., Семенов С.Л., Ясюкевич В.В. Модельные оценки распространения переносчиков некоторых болезней человека в XXI веке в России и соседних странах//Проблемы. экологического мониторинга и моделирования.- 2013.- №25.-С.395-427.

58. Разумов И. А. Моноклональные антитела в изучении структурных белков патогенных для человека вирусов: автореф. дис.... док-ра биол. наук: 03.00.03, 03.00.23/Разумов Иван Алексеевич/ Гос. науч. центр вирусологии и биотехнологии "Вектор". - Кольцово, 2008.-312 с.
59. Ризванов А.А. Вирусные и невирусные методы введения в организм рекомбинантных нуклеиновых кислот: автореф. ...до-ра биол. наук.— Казань, 2010.- 52 с.
60. Романович А.Э. Иммунологические свойства ВИЧ-1envgene – основа ДНК вакцин/А.Э.Романович, Мурашев Б.В., Креславский Т.Ю., Климов Н.А., Козлов А.П.//Медицинская . иммунология.-2001.-3(2).-С.235-236.
61. Румянцева Е.А. Изучение антигенных и иммуногенных свойств культурального штамма ММ/К-05 вируса болезни Найроби, инаktivированного теотропином//Ветеринарная патология.-2007.-№4.- С.100-102
62. Сальников Н.И. Выявление и филогенетический анализ геномов возбудителей Найроби и лихорадки долины Рифт:-автореф.... канд.биол. наук.- Покров,2012.- 27с.
63. Самойлович М. П. Совершенствование гибридной технологии и создание моноклональных антител для систем иммуноанализа: автореф. дис.... д-ра биол. наук:14.00.36 /Самойлович Марина Платоновна/ НИИ эксперим. медицины РАМН.: - С.Пб., 2006. - 37 с.
64. Сандахчиев М.С. Необходимость международного сотрудничества для успеха борьбы с инфекционными заболеваниями и биотерроризмом//Химическая и биологическая безопасность.-2004.-1-2(13-14).-С.3-8
65. Сарбасов А.Б., Ирза В.Н.,Репин П.И., Старов С.К.,Фролов С.В. Протективные свойства вакцин из штамма Ла Сота при заражении цыплят вирулентным штаммом генотипа вируса болезни Ньюкасла//Ветеринария. 2015.-№2.- С.28-34.
66. Середа Л.И., Вишняков И.Ф. Разработка ТФ ИФА для обнаружения антигена вируса ЛДР.//Тез.научн. конф. ВНИИВВиМ.- Покров,1984.-С. 316-318
67. Середа Л.И., Вишняков И.Ф. Обнаружение антител к вирусу ЛДР методом ТФ ИФА// Тез. научн.конф. ВНИИВВиМ.- Покров,1984.-С. 290-292
68. Силко Н.Ю., Глущенко Ю.Г., Шестопалова Л.В., Юрченко К.С. Биологические свойства велогенных штаммов вируса болезни Ньюкасла, изолированных от птиц на Северном Кавказе//Вопросы вирусол.-2013.-Т.58,№1.-С.45-48
69. Смоленский В.И. Средства и методы специфической профилактики болезней птиц вирусной этиологии: автореф. дис.... док-ра биол. наук – М.,1999.-54с.
70. Сафонов Г.А. Разработка и совершенствование средств диагностики и специфической профилактики ньюкаслской юлезни и гриппа птиц: автореф. дис....д-ра биол. наук.- Покров, 1984.-34с.
71. Стрельцов Л.Ф., Ананьев-Рященко Л.С., Артамонова Л.Н., Середа Л.И., Урванцев Н.М. Получение высококонцентрированного полуфабриката инаktivированной вакцины против ЛДР//Тез.докл. науч. конф. ВНИИВВиМ, посвящ. 70-летию Великого Октября.- Покров,1988.-т.3.-С.119-120

72. Суворовцева Е.В. Методы ДНК-доставки и мониторинга фактора некроза опухоли человека на животных моделях: автореф. дис.... канд. биол. наук.-М., 2005.- 25с.
73. Салдан И.П. Чевтаева Л.А., Разумовская Н.А., Меркушев О.А. Птичий грипп в Алтайском крае.//Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунол.-2006.-№5.-С.104-105
74. Супотницкий М.В. «Забытая» иммунология эпидемических, инфекционных и поствакцинальных процессов//Новости медицины и фармации. — 2014. — № 9–10. — С. 19–23; № 11–12. — С. 16–20.
75. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В., и др. Вирусные болезни животных. — М: ВНИИТИБП, 1998.-928 с.
76. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Матвейчев А.В. Экспериментальные модели пригодные для оценки влияния компонентов новых разрабатываемых вакцин на дифференцировку ДК//Медиа.-2014.-2(12).-С.135-153.
77. Терновая С.Ф., Мухамедгалиев Х.Г. Условия постановки твердофазного иммунохемилюминесцентного метода (ТИХЛМ)//Тез. научн. конф. ВНИИВВиМ, посвящ. 30-летию института.- Покров.-1988.-т.2.-с. 142-144
78. Учебно-методические материалы по подготовке к лабораторным и семинарским занятиям по курсу вирусологии./Блиева Л.З., 2012. Режим доступа: nov.docdat.com/docs/idx-16547
79. Усачев Е.В. Генетическая характеристика штаммов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории России и сопредельных государств/Евгений Валерьевич Усачев дис.... канд. биол. наук. — М., 2005.- 122с.
80. Хрипунов Е.М. Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными болезнями животных//Сб. статей Междунар. науч.-практич. конф. ВНИИВВиМ. — Покров, 2000.-С.85-87.
81. Цетлин Е.М. Волкова Р.А. Оработка оптимальной схемы учета результатов применения иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины//Вопросы вирусологии.-1996.-Т.41.-№1.-С.21-24
82. Цилинский Я.Я. Генетика вирусов. Общая и частная ... М.: Медицина. - 1982. - С. 213-259.
83. Чубухова О.В., Никоноров Ю.М. Перспективы применения ДНК-вакцин в профилактике хантавирусных инфекций.//Тихоокеанский Медицинский журнал.-2008.-№2.-С.37-40
84. Черкасский Б.Л. Новые инфекции: мифы и реальность// Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.-2007.-№3.-С.111-116
85. Черникова М.И., Каширина О.С., Васильев Ю.М. Сравнительное изучение иммуoadъювантов при добавлении к инактивированной вакцине против гриппа//Матер. конф. мол. учен. Москва НИИВС им. Мечникова РАМН. -2008-2013.-С.71-88.

86. Шестопалов А.М. Кихтенко Н.В., Сергеев А.Н. и др. Высокопатогенный грипп птиц А(Н5N1): ситуация в 2009-2012 гг. и прогноз пандемического потенциала.//Проблемы особо опасных инфекций.-2013.-вып.1.-С.44-50
87. Черных А.А., Митин Н.И. Получение гибридом, секретирующих моноклональные антитела к нуклеопротеину вируса гриппа птиц/Тез.науч. конф. ВНИИВВиМ, посвящ. 30-летию института.- Покров,1988.-т.2.-с.184-186
88. Черных А.А., Митин Н.И., Бакасарин С.Ш. Диагностика гриппа птиц твердофазным иммуноферментным методом на основе МКА// Тез.докл. научн. конф. ВНИИВВиМ, посвящ. 30-летию института.- Покров,1988.-т.2.-С.136-142
89. Чехонин В. П., О. И. Гурина, Т. Б. Дмитриева Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам .- М.: Медицина, 2007.-344 с.
90. Чехонин В. П., Ребухин И.А. Усовершенствование технологии получения МКА//Вестник службы крови России.-2000.-№1.-С.5-8
91. Чуфарова Е. В., Смирнов В.Н. Разработка вакцины против оспы птиц и ньюкаслской болезни// Матер. Научн.-практич. Конфер., посвящ. 45-летию ВНИИВВиМ, 2003.-ч.2.-С.505-509.
92. Южук Т.Э. Лагуткин Н.А., Зеленцов В.А. DASS-система-флуоресцентный метод для специфического обнаружения вирусов и их антигенов.// Тез.докл. научн. конф. ВНИИВВиМ, посвящ. 70-летию Великого Октября.- Покров,1988.-т.2.-С.145-147
93. Ягудина Р.И., Тихомирова А.В. История развития МКА и их настоящее и будущее//Современная организация лекарственного обеспечения.-2013.-№1.-С.6-27
94. ЯрилинА.Л. Основыиммунологии. М., Медицина, 1999. -608 с.
95. **Abdo-Salem S**, Waret-Szkuta A, Roger F, Olive MM, Saeed K, Chevalier V. Risk assessment of the introduction of Rift Valley fever from the Horn of Africa to Yemen via legal trade of small ruminants.//Trop Anim Health Prod - 2011.-43.-P. 471–80.
- 96.**Abd El Salam E.T.**, W.I. Ashour, M.M. AlKhazindar, B.H. Zahran Production of Recombinant Rift Valley Fever Virus Glycoprotein 1 by Bacterial System. //International Journal of Virology.- 2014.-10.-P.168-179.
97. **Adam I. and Karsany M. S.** Case report: Rift Valley fever with vertical transmission in a pregnant Sudanese woman.//J Med Virol 2008.-80(5).-P.929-931.
98. **Adam I. and Karsany M. S.** Manifestation of sevesre RVF in Sudan//Int J Inzect Dis.-2010.-14.-P.179-180
99. **Al-Afaleq A. I. and Hussein M. F.** The status of Rift Valley fever in animals in Saudi Arabia: a mini review.//Vector Borne Zoonotic Dis.-2011.-11.-P.1513-1520.
100. **Aldous EW.**, Mynn JK., AlexanderDJ/ A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isilates by phylogenetic analysis of partial nucleotide sequence of the fusion protein gene//Avian Pathol.-2003.-32(3).-P.239-256
101. **Adler A., Eames K.T.**, Fun K., Edmund W.J. Incidence and risk for influenza-like-illbess in the UK//BMCI Infectious Diseases.-2014.-14.-P.232-240

102. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species.//Vet. Microbiol.-2000.-74(1-2).-P.3-13
103. **Alexander DJ.**, Bell JG., Alders RG. A technology review: Newcastle disease – with special emphasis on its effects on village chicken, chapter 1-3 //Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2004.- P.23-63
104. **Alexander DJ.**, Aldous EW., Fuller C. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research//Avian Pathol.-2012.-vol.41(14).-P. 329-335.
105. **Al-Hazmi M.** Epidemic Rift Valley fever in Saudi Arabia: a clinical study of severe illness in humans/M.Al-Hazmi, E. A.Ayoola, M.Abdurahman, S.Banzal et al.//Clin Infect Dis. -2003.-36.-P.245-252.
106. **Alrajhi, A. A.**, A. Al-Semari & J. Al-Watban, Rift Valley fever encephalitis//Emerg Infect Dis. -2004.-10.-P.554-555.
107. **Anderson G. W.** and Smith J. F. Immunoelectron microscopy of Rift Valley fever viral morphogenesis in primary rat hepatocytes.//Virology.- 1987.-161.-P.91-100.
108. **Anderson G. W.**, Lee J. O., Anderson A. O., Powell N., Mangiafico J. A., and Meadors G. Efficacy of a Rift Valley fever virus vaccine against an aerosol infection in rats./G. W.Anderson, Lee J. O., Anderson A. O., Powell N., Mangiafico J. A., and Meadors G.//Vaccine.- 1991.-9.-P. 710-714.//
109. **Anderson G. W.**, Slone T. W., and Peters C. J. Pathogenesis of Rift Valley fever virus in inbred rats.//Microb. Pathog -1987.-2.-P.283-293.
110. **Antonis AF**, Kortekaas J, Kant J, Vloet RP, Vogel-Brink A, Stockhofe N, Moormann RJ. Vertical transmission of Rift Valley fever virus without detectable maternal viremia.//Vector Borne Zoonotic Dis. -2013.-13(8).-P. 601-606.
111. **Anyamba A.**, Prediction of a Rift Valley fever outbreak/A.Anyamba, J. P. Chretien, J. Small, C. J. Tucker, et al.//Proc Natl Acad Sci U S A -2009.- 106.-P. 955-959.
112. **Anziliero D.** A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidine kinase and glycoprotein E is attenuated and immunogenic for calves/D. Anziliero, Santos, C.M.B., Bauermann, F.V., Cardoso, L., et al.//Pesq. Vet. Bras.-2011.-31, 1.-P. 23–30.
113. **Archer B. N.** Outbreak of Rift Valley fever affecting veterinarians and farmers in South Africa 2008/B. N.Archer, Weyer J., Paweska J., Nkosi D., et al.//S Afr Med J.-2011.-101.-P.263-266.
114. **Arishi H. M.**, Aqeel A. Y., and Al Hazmi M. M. Vertical transmission of fatal Rift Valley fever in a newborn.//Ann Trop Paediatr.- 2006. – 26.-P.251-253.
115. **Armengol G.**, Ruiz L.M., Orduz S. The injection of plasmid DNA in mouse muscle results in lifelong persistence of DNA gene expression and humoral response. Mol Biothechnol.-2004.- 24.-P. 3057-3062
116. **Askew D.** CpG DNA induces maturation of DC with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms/ D.Askew, RS.Chu, AM. Harding et al.//J. Immunol.-2000.-165(12).-P.6889-6895
117. **Baalp A.**, Yucel F. Development of mouse hybridomas by fusion of myeloma cells with lymphocytes derived from spleen, lymph node, and bone marrow. // Hybridoma and Hybridomics.- 2003.- V. 22.- P. 329-331.

118. **Babiuk S.**, Bowden T. R., Boyle D. B., Wallace D. B., Kitching R. P. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. //Transbound Emerg Dis.-2008.-55.-P.263-272.
119. **Bales J. M.**, Powell D. S., Bethel L. M., Reed D. S., and Hartman A. L. Choice of inbred rat strain impacts lethality and disease course after respiratory infection with Rift Valley fever virus. //Front Cell Infect Microbiol -2012.-2.-P.105-110.
120. **Balkhy, H. H. & Z. A. Memish**, Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian Peninsula. //Int J Antimicrob Agents .-2003.-21.-P.153-157.
121. **Bates M.K.**, Zang G., M.G. Sebestyen et al. Genetic immunization for generation antibody.//Bio Technique.-2006.-v.40(2).-P.199-207.
122. **Balenghien T**, Cardinale E, Chevalier V, Elissa N, Failloux AB, Jean Jose Nipomichene TN, et al. Towards a better understanding of Rift Valley fever epidemiology in the south-west of the Indian Ocean/T. Balenghien, Cardinale E, Chevalier V, Elissa N, Failloux AB, et al.//Vet Res.- 2013.-44.-P.78.
123. **Besselaar T. G.**, Blackburn N. K. Topological mapping of antigenic sites on the Rift Valley fever virus envelope glycoproteins using monoclonal antibodies.//Arch Virol .-1991-. 121.-P. 111-124.
124. **Barnett S.** Enhanced DNA prime-protein boost vaccines induce potent immune responses against HIV-I/ S. Barnett, G. Otten, I Srivastava et al. //Retroviruses of Human,XIII Cent Gardes Symposium. -2003.-P.145-153, Elsevier, New York.
125. **Barr, I.G.** A new pandemic influenza A(H1N1) genetic variant predominated in the winter 2010 influenza season in Australia, New Zealand and Singapore/ I.G.Barr, L.Cui, N.Komadina, R.T., Lee, et al. //Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. -2010.-15 (42).-P.19692
126. **Barry ME.** Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection/ME.Barry, D. Pinto-Gonzalez,FM.Orson et al.//Hum Gene Ther.-1999.-10(15).-P.2461-2480
127. **Baskerville A.**, Hubbard K. A., and Stephenson J. R. Comparison of the pathogenicity for pregnant sheep of Rift Valley fever virus and a live attenuated vaccine.//Res Vet Sci.-1992.-52.-P.307-311.
128. **Battles J. K.** and Dalrymple J. M. Genetic variation among geographic isolates of Rift Valley fever virus.//Am J Trop Med Hyg -1988.-39.-P.617-631.
129. **Beaty BJ** Evolution of bunyaviruses by genom reassortment in dually infected mosquitoes (*Aedes triseriatus*)/BJ Beaty, DR Sundin, LJ Chandler. DH Bishop//Science.-1985.-230.-P.548-550
130. **Belakova J.**, Horynova M., Krupka M., Weigl E., and Raska M. DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future?//Arch Immunol Ther Exp -2007.-55.-P.387-398.
131. **Bernard A.P.** Immunology 101 series. Adjuvants, aluminum and gelatin. The scientific scoop on vaccine ingredients.// Режим доступа: <http://teamvaccine.com/2014/07/11/immunology>

132. **Bertley FM**, Ibrahim SA, Libman M, Ward BJ. Measles vaccination in the presence of maternal antibodies primes for a balanced humoral and cellular response to revaccination. // *Vaccine*.-2004.-23.-P.444–9. doi:10.1016/j.vaccine.2004.06.021
133. **Besselaar, T. G. & N. K. Blackburn** The effect of neutralizing monoclonal antibodies on early events in Rift Valley fever virus infectivity.// *Res Virol*.-1994.-145.-P. 13-19.
134. **Beutler B. A.** TLRs and innate immunity// *Blood*.-2009.-Vol.113.-P.1399-07.
135. **Bhardwaj N.**, Heise M. T., Ross T. M. Vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or alphavirus replicons expressing Gn protects mice against Rift Valley fever virus.// *PLoS Negl Trop Dis* -2010.- 4:e725.
136. **Bhella D** Significant differences in nucleocapsid morphology within the *Paramyxoviridae*/ D Bhella, A Ralph, LB Murphy, RP Yeo// *J Gen Virol*.-2002.-83.-P/1831-1839
137. **Billecocq A.** NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription/A.Billecocq, Spiegel M., Vialat P., et al.// *J Virol*.-2004.-78.-P.9798-9806.
138. **Bird B. H.**, Khristova M. L., Rollin P. E., Ksiazek T. G., Nichol S. T. Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry.// *J Virol*.-2007.-81-P.2805-2816.
139. **Bird B. H.**, Albarino C. G., Nichol S. T. Rift Valley fever virus lacking NSm proteins retains high virulence in vivo and may provide a model of human delayed onset neurologic disease.// *Virology* -2007.- 362.-P.10-15.
140. **Bird B. H.**, Bawiec D. A., Ksiazek T. G., Shoemaker T. R., Nichol S. T. Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus.// *J Clin Microbiol*.-2007.-45.-P.3506-3513.
141. **Bird B. H.**, Albarino C. G., Hartman A. L., Erickson B. R., Ksiazek T. G., Nichol S. T. Rift Valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals.// *J Virol*.-2008.- 82.-P.2681-2691.
142. **Bird B. H.**, Ksiazek T. G., Nichol S. T., Maclachlan N. J. Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc* -2009.-234.-P.883-893.
143. **Bird B. H.**, Rift Valley fever virus vaccine lacking the NSs and NSm genes is safe, nonteratogenic, and confers protection from viremia, pyrexia, and abortion following challenge in adult and pregnant sheep./ Bird B. H., Maartens L. H., Campbell S. et al.// *J Virol*.- 2011.-85.-P.12901-12909.
144. **Bird B. H.**, Nichol S. T. Breaking the chain: Rift Valley fever virus control via livestock vaccination.// *Curr Opin Virol*.-2012.-2.-P.315-323.
145. **Blackburn N. K.** and Besselaar T. G. A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies.// *J Virol Methods*.-1991.-33.-P.367-374.

146. **Bohm E.**, Establishment of a strategy for the rapid generation of a monoclonal antibody against the human protein SNEV (hNMP200) by flow-cytometric cell sorting./E.Bohm, Grilla H J., Voglauer R., Gross S., Ernst W., et al.//Hi. Immunol. Meth.- 2005.-v. 307.- P. 13-23.
147. **Borrebaeck C.A.K.** Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. //Trends in Immunol.- 2000.-V. 21.- P. 379-382
148. **Borucki MK.**, Chandler LJ., Parker BM., Blair CD., BeatyBJ. Bunyavirus superinfection and segment reassortment in transovarially infected mosquitoes.//J.Gen. Virol.- 1999.-v.80.-P.3173-3179
149. **Boshra H.**, Lorenzo G., Busquets N., and Brun A. Rift Valley fever: recent insights into pathogenesis and prevention.//J Virol.- 2011.-85.- P.6098-6105.
150. **Boshra H.**, Lorenzo G., Rodriguez F., and Brun A. A DNA vaccine encoding ubiquitinated Rift Valley fever virus nucleoprotein provides consistent immunity and protects IFNAR(-/-) mice upon lethal virus challenge. //Vaccine.-2011.-29.- P. 4469-4475.
151. **Brown JL**, Dominik JW, Morrissey RL. Respiratory infectivity of a recently isolated egyptian strain of rift valley fever virus. Infect Immun.- 1981.-33.-P.848–853.
152. **Bossi, P.** Bichat guidelines for the clinical management of haemorrhagic fever viruses and bioterrorism-related haemorrhagic fever viruses/P.Bossi, A. Tegnell, A. Baka, F. Van Loock, J. Hendriks, A. Werner, H. Maidhof & G. Gouvras//Euro Surveill.- 2004.-9.-P. E11-12.
153. **Botros B.**, Adverse response of non-indigenous cattle of European breeds to live attenuated Smithburn Rift Valley fever vaccine/B. Botros, Omar A., Elian K., Mohamed G., Soliman A., et al.// J Med Virol.-2006.-78.-P.787-791.
154. **Bousso P.**, Robey E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes.//Nat Immunol. -2003.- 4 (6).-P. 579–85.
155. **Booth, T.F.**; Gould, E.A.; Nuttall, P.A. Structure and morphogenesis of Dugbe virus (Bunyaviridae) studied by immunogold electron microscopy of ultrathin cryosections.//Virus Res.-1991.- 21.- P.199–212.
156. **Boston A.**, Pringle C.R. Order *Mononegavirales* in King A. M.Q., Adams M.J. et al., Virus Taxonomy – ninth report of the International Committee on taxonomy of Viruses, London, UK:Elsevier/Academic Press.-2011.- P.653-657.
157. **Brennan B.**; Welch, S.R.; Elliott, R.M. The consequences of reconfiguring the ambisense S genome segment of Rift Valley fever virus on viral replication in mammalian and mosquito cells and for genome packaging.//PLoS Pathog. -2014.-10.- e1003922.
158. **Bouard D., D.** Alazard-Dany, F. L. Cosset Viral vectors: from virology to transgene expression. //Br J Pharmacol.- 2009.-157.-P. 153-165.
159. **Bouloy M.**, Janzen C., Vialat P., Khun H., Pavlovic J., Huerre M., Haller O. Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of Rift Valley fever virus nonstructural protein NSs.//J Virol.-2001.- 75.-P.1371-1377.

160. **Bouloy, M.**, R. Flick Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. //Antiviral Res.- 2009.-84.-P. 101-118.
161. **Bouloy M.** and Weber F. Molecular biology of Rift Valley fever virus.// Open Virol. J.-2010.4.-P. 8-14.
162. **Boyman O**, Sprent J The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system//Nature reviews immunology.-2012.-12(3).- P.180-190
163. **Bowen MD** et al., A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia.//Virology.-2001.- v.291-P.2237-2247
164. **Braakman I.** Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum/I.Braakman, van Anken E.//Traffic.-2000.-v.1(17).-P.533-539
165. **Brave A.**, Ljungberg K., Wahren B., and Liu M. A.Vaccine delivery methods using viral vectors.//Mol Pharm.-2000.-4.-P.18-32.
166. **Bridgen, A. & R. M. Elliott**, Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs.//Proc Natl Acad Sci U S A.-1996.-93.-P.15400-15404.
167. **Britch SC** RVF risk map model and seroprevalence in selected wild ungulates and camels from Kenya/ SC Britch, YS Binopal, MG Ruder et al.//PLoS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0066626.sep.10,2014.
168. **Bukreyev A. and Collins P. L.** Newcastle disease virus as a vaccine vector for humans.//Curr Opin Mol Ther.- 2008.-10.-P.46-55.
169. **Busquets N.** Experimental infection of young adult European breed sheep with Rift Valley fever virus field isolates./N.Busquets, Xavier F., Martin-Folgar R., Lorenzo G., et al.// Vector Borne Zoonotic Dis.- 2010.-10.-P.689-696.
170. **Calarota S.** Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination/S.Calarota, G.Bratt, S.Nordlund et al.//Lancet.-1998.-351.-P.1320-1325
171. **Calisher C. H.**, Childs J. E., Field H. E., Holmes K. V., Schountz T.Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. //Clin Microbiol Rev.-2006.- 19.-P.531-545.
172. **Caplen, H.**, C. J. Peters & D. H. Bishop Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development.//J Gen Virol.-1985.-66.-P. 2271-2277.
173. **Capstick P. B.** and Gosden D. Neutralizing antibody response of sheep to pantropic and neutrotropic Rift Valley fever virus.//Nature- 1962.-195.-P.583-584.
174. **Capua I** Vaccination as a tool to combat introductions of notifiable avian influenza virus in Europe, 2000-2006/ I. Capua, A Schmitz, V Jestin, G Koch, S Marangon//Rev.sci.tech. off.int.Epiz.-2009.-28(1).-P.245-259
- 175.**Carnec X.** Role of the cytosolic tails of Rift Valley fever virus envelope glycoproteins in viral morphogenesis/X.Carnec , Ermonval M, Kreher F, Flamand M, Bouloy M//Virology.- 2014.- 5.-448.-P. 1-14. doi: 10.1016/j.virol.2013.09.023. Epub 2013 Oct 16.
176. **Carroll SA**, Genetic evidence for Rift Valley fever outbreaks in Madagascar resulting from virus introductions from the East African mainland rather than enzootic

- maintenance./SA Carroll, JM Reynes, ML Khristova, et al.//J Virol.- 2011.- 85.-P.6162–6167
177. **Cattoli G.**, Mandell RJ., Tisato E., Banks J., Capua I. Characterization of Newcastle disease viruses isolated in Italy in 2000//Avian Pathology.-2001.-30.-P.-465-469
178. **Cetre-Sossah C.** Prevalence of Rift Valley fever among ruminants, Mayotte/C.Cetre-Sossah, A.Pedarrieu, H.Guis, C.Defernez et al.//Emerg Infect Dis.-2012.-18.-P.972-975.
179. **Chabalgoity JA**, Baz A, Rial A, Grille S The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines//Cytokine and growth factor reviews.-2007.-18(1-2).-P.195-207
180. **Chemical** and Biological Weapons: Possession and Programs Past and Present//Режим доступа:<http://cns.miis.edu/cbw/posses.htm>
181. **Chen S.** Heterocellular induction of interferon by negative-sense RNA viruses/S.Chen, J.A.L. Short, D.F. Young, M.J. Killip, et al.// Virology. -2010.– 25.-407(2-8).-P. 247–255.
182. **Cito F.**, Narcisi V, Danzetta ML. et al. Analisis of surveillance systems in place in European Mediterranean Countries for West Nile and RVF/F. Cito, V. Narcisi, M.L. Danzetta et al.//Transboundary and emerging diseases.-2013.-v.60(2).-P.40-44
183. **Collin EA**, Sheng Z, Lang Y, Ma W, Hause BM, Li F Cocirculation of Two Distinct Genetic and Antigenic Lineages of Proposed Influenza D Virus in Cattle//J. Virol. January -2015.- 89(2).-P. 1036-1042.
184. **Chomel D.D.**, Sun D. Bioterrorism and invasive species//Rev.sci tech.off int Epiz.-2010.-29(2).-P.193-199
185. **Chaplin D. D.** Overview of the immune response.//J Allergy ClinImmunol.- 2010.-125.-P.3-23.
186. **Chevalier V.** Relevance of Rift Valley fever to public health in the European Union.//Clin. Microbiol.Infect.-2013.-19.-P.705–708.
187. **Chomczynski P.**, N. Sacchi The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on// J. Nature protocols.-2006.-8(1).- P.581-585
188. **Coetzer J. A.**The pathology of Rift Valley fever. I. Lesions occurring in natural cases in new-born lambs//Onderstepoort J Vet Res -1977.-44.-P.205-211.
189. **Coffman RL.**, Shee A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work// Immunity.-2010.-33.-P.492-503
190. **Collett, M.S.**, Kakach, L.T., Suzich, J.A., Wasmoen, T.L. The biology of negative strand viruses. Elsevier.In: Genetics and Pathogenicity of Negative Strand Viruses (D. Kolakofsky and B. Mahy, eds) -1989, Elsevier Science, Amsterdam (in press)
191. **Coloma Ret J. M.** Valpuesta, R. Arranz, J. L. Carrascosa, J. Ortín, J. Martín-Benito The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex//PLoS Pathog. -2009 DOI: 10.1371/journal.ppat.1000491
192. **Cross KJ** Composition and function of influenza fusion peptide./KJ Cross, Langley WA., Russell RJ., Skehel JJ, Steinhauer DA.//Protein Pept Lett.-2009.-v.16(7).-P. 766-778

193. **Cribbs D.H.** Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amiloid/D.H.Cribbs, Ghochikyan A., Vasilevko V., Tran M., Petrushina I. et al.//Int immunol.-2003.-15(4).-P. 505-514.
194. **Daubney R.**, Hudson J. R., Garnham P. C. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever, an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from east Africa. J Path Bacteriol - 1931.-34.-P. 545-579.
195. **Davies FG.** Risk of Rift Valley fever epidemic at the Hajj in Mecca, Saudi Arabia.//Rev Sci Tech.-2006.-25.-P.137-47.
196. **Davies F. G. and Addy P. A.** Rift Valley fever. A survey for antibody to the virus in bird species commonly found in situations considered to be enzootic. //Trans R Soc Trop Med Hyg.-1979.-73.-P.584-585.
197. **Davies F. G., Highton R. B.** Possible vectors of Rift Valley fever in Kenya. //Trans R Soc Trop Med Hyg.-1980.-74.-P. 815-816.
198. **Davies F. G.** The historical and recent impact of Rift Valley fever in Africa.// Am J Trop Med Hyg.- 2010.-83.-P.73-74.
199. **Davis H.L.** DNA vaccines for viral diseases /H.L. Davis, M.J. McCluskie // Microbes and Infection.– 1999. – Vol. 1. – P. 7–21.
200. **Daubney R. and Hudson J. R.** Rift Valley fever.//Lancet 1932.-219.-P.611-612.
201. **Dean H. J.**, Haynes J., and Schmaljohn C. The role of particle-mediated DNA vaccines in biodefense preparedness.//Adv Drug Deliv Rev.-2005.-57.-P.1315-1342.
202. **de Boer S. M.** Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge/S. M. de Boer, Kortekaas J., Antonis A. F., Kant J., van Oploo J. L., et al.//Vaccine.- 2010.-28.-P.2330-2339.
203. **de Boer S. M.**, Kortekaas J., de Haan C. A., Rottier P. J., Moormann R. J., Bosch B. J.Heparan sulfate facilitates Rift Valley fever virus entry into the cell.//J Virol.- 2012.-24.-P.13767-13771.
204. **de Boer S. M.**, Kortekaas J., Spel L., Rottier P. J., Moormann R. J., Bosch B. J. Acid-activated structural reorganization of the Rift Valley fever virus Gc fusion protein.// J Virol.- 2012.-24.-P. 13642-13652.
205. **Denis-Mize K.** Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines/ K. Denis-Mize, M. Dupuis, M.Singh et al.//Cell.Immunol.-2003.-225.-P.12-20
206. **Diallo M.** Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley fever and other arboviruses (Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal./ Diallo M., Nabeth P., Ba K.et al. // Med Vet Entomol.- 2005.-19.-P. 119-126.
207. **Diel DG,** da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL..Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes.//Infect. Genet.Evol.- 2012.-12(8).-P. 1770 –1779.
208. **Digoutte J. P.**, Jouan A., Le Guenno B., Riou O., Philippe B., Meegan J., Isolation of the Rift Valley fever virus by inoculation into *Aedes pseudoscutellaris* cells: comparison with other diagnostic methods. //Res Virol.- 1989.-140.-P.31-41.

209. **Dodd KA**, McElroy AK, Jones TL, Zaki SR, Nichol ST, Spiropoulou CF. Rift Valley fever virus encephalitis is associated with an ineffective systemic immuneresponse and activated T cell infiltration into the CNS in an immunocompetent mouse model.//PLoS Negl Trop Dis.- 2014.-8:e2874.
210. **Dodd K. A.** Single-dose immunization with virus replicon particles confers rapid robust protection against Rift Valley fever virus challenge./Dodd K. A., Bird B. H., Metcalfe M. G. et al.// J Virol -2012.-86.-P.4204-4212.
211. **Dodd K. A.**, Nichol S. T., McElroy A.K. Rift Valley fever virus clearance and protection from neuroploic disease are dependent on CD4+T cell and virus-specific antibody respons.//J. Virol.-2013.-87.-P.6161-6171.
212. **Dortman D.P.** Emerging infectious diseases//J Tracking and Analyzing disease trends page -2014.-P.1273-1432
213. **Donnelly, J. J.**, B. Wahren & M. A. Liu, DNA vaccines: progress and challenges. J Immunol.-2005.-175.-P.633-639.
214. **Donald DR** Sructure of the RVF virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation/DR Donald, ME Piper, SR Gerrard, JL Smith//Current ISSUE.-2010.-v.107(26).-P.11769-11774
215. **do Valle** A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever./do Valle T. Z., Billecocq A., Guillemot L., et al.// J Immunol.- 2010.-185.-P.6146-6156.
216. **Drolet B. S.** Development and evaluation of one-step rRT-PCR and immunohistochemical methods for detection of Rift Valley fever virus in biosafety level 2 diagnostic laboratories./ Drolet B. S., Weingartl H. M., Jiang J. et al. //J Virol Methods.- 2012.-179:373-382.
217. **Drosten, C.** Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR./ Drosten, C., S. Gottig, S. Schilling, et al.//J Clin Microbiol -2002.-40: 2323-2330.
218. **Duckatez M**, E Pelletier, G. Meyer Influenza D virus in cattles. France 2011-2014//Emerg.Ifect. Dis.-2015.-21(2).-P.368-371
219. **Dungu B**, Donadeu M, Bouloy M. Vaccination for the control of Rift Valley fever in enzootic and epizootic situations.//Dev Biol (Basel).- 2013.-135.-P.61-72.
220. **Easton A.**Pringle CR.Order Mononegavirales, in King A.M.Q: Adams M.J. et al.,Virus Taxonomy – Ninth report of the International Committee on Taxonomy of viruses, London UK: Elsevier/Academic Press.-2011.-P.653-657.
221. **El Mamy AB**, Lo MM, Thiongane Y, Diop M, Isselmou K, Doumbia B, Comprehensive phylogenetic reconstructions of Rift Valley Fever virus: The 2010 northern Mauritania outbreak in the *Camelus dromedarius* species.//Vector Borne Zoonotic Dis.- 2014.-14(12).-P. 856-61
222. **El-HarrakM.** Rift Valley and West Nile Virus Antibodies in Camels, North Africa/M. El-Harrak, R. Martín-Folgar, F. Llorente et al. //Emerg Infect Dis. -2011.-17(12).-P. 2372–2374.

223. **El Mamy A. B.**, Unexpected Rift Valley fever outbreak, northern Mauritania /El Mamy A. B., Baba M. O. Barry, Y. et al.//Emerg Infect Dis -2011.-17.-P.1894-1896.
224. **Essam HI, Sabet SF, Fahmy AM** Preparation and immunogenicity of fusion RVFV Gn protein//J.Biotechnol. Res.-2010.-v.10.-P.39-55
225. **Evans A.**, Prevalence of antibodies against Rift Valley fever virus in Kenyan wildlife./A. Evans, Gakuya F., Paweska J. T.et al.//Epidemiol Infect -2008.-136.-P.1261-1269.
226. **Evans RK** Characterization and biological evaluation of microparticle adjuvant formulation for plasmid DNA vaccines//RK. Evans, DM. Zhu, DR. Casimiro et al.//J. Phrm.Sci.-2004.-93.-P.1924-1939
227. **Euler M**, Wang Y, Nentwich O, Piepenburg O, Hufert FT, Weidmann M. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus.//J Clin Virol.- 2012.-54.-P. 308–312.
228. **Fazekas de St. Groth, Scheidegger D.** Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. //J.Immunol. Meth., -1980.- V.35, P. 1-21.
229. **Faburay B**, Wilson W, McVey DS, Drolet BS, Weingartl H, Madden D, et al. Rift Valley fever virus structural and non-structural proteins: recombinant protein expression and immunoreactivity against antisera from sheep.//Vector Borne Zoonotic Dis.- 2013.-13.-P. 619–29.
230. **Fafetine J.**, Tijhaar E., Paweska J. T.et al. Cloning and expression of RVF virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of a N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants.//Vet Microbiol.-2007.-121.-P.29-38
231. **Faurez F.** Biosafety of DNA vaccines: new generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection/F. Faurez, D. Dory, R. Gravier et al.//Vaccine.-2010.-28.-P.3888-3895
232. **FAO** animal production and health proceedings/FAO 13: influenza and other emerging zoonotic diseases at human-animal interface: FAO/OIE/WHO Joint scientific consultation -27-29 April 2010. Verona (Italy).-Rome:
233. **Ferraro B.**, Morrow M. P., Hutnick N. A., Shin T. H., Lucke C. E., Weiner D. B. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. //Clin Infect Dis -2011.-v.53.-P.296-302.
234. **Filone, C. M.**, M. Heise, R. W. Doms & A. Bertolotti-Ciarlet Development and characterization of a Rift Valley fever virus cell-cell fusion assay using alphavirus replicon vectors. //Virology -2006.-356.-P.155-164.80.
235. **Flik R.**, Bouloy M. Rift valley fever virus.//Curr.Mol.Med.-2005.-5.-P827-834
236. **Fodor I.** Gene immunization of mice with plamid DNA expressinf rabies virus glycoprotein/ I.Fodor L. Kucsera, Fodor N, V Palfi//Acta Vet. Hung.- 2000.- 48(2).-P.229-236
237. **Fontana J.M.**, Bankamp B., Rota P.A. Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses.//Immunol. Rev. -2008-225(1).-P.46–67.

238. **Foburay B**, Lebedev M, McVey DS, Wilson W, Morozov I, Young A. A glycoprotein subunit vaccine elicits a strong Rift Valley fever virus neutralizing antibody response in sheep.//*Vector Borne Zoonotic Dis.*- 2014.-14.-P. 746–56.
239. **Frank-Peterside, N.** Response of laboratory staff to vaccination with an inactivated Rift Valley fever vaccine-TSI-GSD 200. //*Afr J Med Med Sci* -2000.-29.-P.89-92.
240. **Freiberg, A. N.** Three-dimensional organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography. /Freiberg, A. N., M. B. Sherman, M. C. Morais, M. R. Holbrook & S. J. Watowich //*J Virol* -2008.-82.-P.10341-10348.
241. **Fukushi S.** Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. /Fukushi S., Nakauchi M., Mizutani T. et al. //*J Virol Methods* -2012.-180.-P.68-74.
242. **Gad, A.M.;** Hassan, A.N.; Merdan Transmission of Rift Valley fever virus by different geographic strains of *Culex pipiens* in Egypt. //*J. Egypt Pub. Health Assoc.* - 1989- 64.-P.363–379.
243. **Garçon N., G.** Leroux-Roels, Wen-Fang ChengVaccine adjuvants//*Perspectives in Vaccinology.* -2011.-V. 1(1).-P.89–113
244. **Garcea, R. L., L. Gissmann** Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. //*Curr Opin Biotechnol* -2004.-15: 513-517.
245. **Garcia,** Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds./Garcia, S., J. M. Crance, A. Billecocq, et al.//*J Clin Microbiol* -2001.-39: 4456-4461.
246. **Garry, C. E. & R. F. Garry** Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes)//*Theor Biol Med Model* -2004.-1.-P.10-15.
247. **Gale P,** Brouwer A, Ramnial V, Kelly L, Kosmider R, Fooks AR, et al. Assessing the impact of climate change on vector-borne viruses in the EU through the elicitation of expert opinion.//*Epidemiol Infect.*- 2010.-138.-P.214–25.
248. **Gefter M.L.,** Margulies D.H. Scharff M.D. A simple method for polyethylene glycol- promoted hybridization of mouse myeloma cells.//*Somatic Cell Genet.*- 1977-V. 3, P. 231236
249. **Gerdes GH.** Rift valley fever virus.//*Rev.Sci.Tech.*-2004.-23.-P.613-623
250. **Gerrard, S. R.,S. T. Nichol** Characterization of the Goldgi retention motif of rift valley fever virus Gn glycoprotein//*J. SVirol.*-2002.-76(23).-P.12200-12210
251. **Gerrard S. R., Bird B. H.** The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection. //*Virology* -2007.-359.-P.459-465.
252. **Gerrard, S. R. & S. T. Nichol** Synthesis, proteolytic processing and complex formation of N-terminally nested precursor proteins of the Rift Valley fever virus glycoproteins.// *Virology* -2007.-357.-P.124-133.
253. **Gharaibeh S.,** Mahmoud K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens.//*Poult Sci* (2013) **92**: 2333–2336.doi:10.3382/ps.2013-03249

254. **Global Influenza Programme**//Режим доступа.
<http://www.who.int/topics/influenza/en>
255. **Gogoi P.** Complete Genome Sequence of a Newcastle Disease Virus Isolate from an Outbreak in Central India /P.Gogoi, S.Morla, Megha Kaore et al.// *Genome Announc.* 2015 Jan-Feb; 3(1): e01418-14. Published online 2015 Jan 15.
256. **Goodbourn S.,** Randall R.E. The regulation of type I interferon production by paramyxoviruses. *J. Interferon Cytokine Res.* -2009-29(9).-P.539–547.
257. **Gooding JV** Antibody production by hybridomas//*J.Immunol. Meth.*-1980.-39,4.-P.357-372
258. **Ghudasara S.N.,** Roy A., Bhaderi B.B. Comparison of standard tube agglutination and indirect ELISA tests for detection of antibody in cow and buffaloes against RVF//*Veterinary World.*-2010.-v.3(2).-P.61-64.
259. **Gorchakov P.** Comparative analysis of the alphavirus-based vectors expressing RVF virus glycoproteins/ P.Gorchakov, E. Volkova, N.Yun//*Virology.*-2007.-366(1).-P.212-225.
260. **Gowen B. B.** Single-Dose Intranasal Treatment with DEF201 (Adenovirus Vectored Consensus Interferon) Prevents Lethal Disease Due to Rift Valley Fever Virus Challenge/B. B. Gowen, J. Ennis, K. W. Bailey, Z. Ves//*Viruses.*-2014.-v.6(3).-P.1410-1423; doi:10.3390/v6031410
261. **Grgacic E. V.** Anderson D. A. Virus-like particles: passport to immune recognition. // *Methods.*-2006.-40.-P. 60-65.
262. **Grobbelaar A** Molecular epidemic of RVF virus in recent outbreaks in South Africa/A Grobbelaar, J Weyer, PA Leman, A Kemp, JT Paweska, R. Swanepoel // *Emerg.Infect.Dis.*-2011.-v.17(12).-P.2270-2276.
263. **Guu T.S.,** Zheng W., and Tao Y.J. Bunyavirus: structure and replication. // *Adv Exp Med Biol* -2012.-726.-P.245-266
264. **Gu M.,** Huang, J.; Chen, Y.; Chen, J.; Wang, X.; Liu, X.; Liu, X. Genome sequence of a natural reassortant H5N2 avian influenza virus from domestic mallard ducks in eastern China. *J. Virol.* - 2012.-86.-P.12463–12464.
265. **Habjan M.** Efficient production of Rift Valley fever virus-like particles: The antiviral protein MxA can inhibit primary transcription of bunyaviruses. / Habjan M., Penski N., Wagner V., et al. // *Virology* -2009.-385.-P. 400-408.
266. **Habjan, M.** NSs protein of rift valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase./ Habjan, M.; Pichlmair, A.; Elliott, R.M. et al. // *J. Virol.* -2009- 83.-P. 4365–4375.
267. **Hale B.G.,** Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. // *J. Gen. Virol.* -2008.-89(Pt 10).-P. 2359–2376.
268. **Hansson M.,** Nygren P. A., and Stahl S. Design and production of recombinant subunit vaccines.// *Biotechnol Appl Biochem* -2000.-32.-P.95-107.
269. **Harandi AM,** Medaglini D, Shattock RJ. Vaccine Adjuvants: a priority for vaccine research./AM. Harandi D, Medaglini, RJ.Shattock//*Vaccine.*-2010.-28(12).-P.2363-2366

270. **Harmon B.** Rift Valley fever virus strain MP-12 enters mammalian host cells via caveola-mediated endocytosis./ B Harmon , BR Schudel , D Maar ,et al.//J Virol. 2012.- 86(23).-P. 12954-70.
271. **Harrington D. G.** Evaluation of a formalin-inactivated Rift Valley fever vaccine in sheep./ Harrington D. G., Lupton H. W., Crabbs C. L. et al. //Am J Vet Res -1980.-41.-P.1559-1564.
272. **Hartman AL**, Aerosolized rift valley fever virus causes fatal encephalitis in african green monkeys and common marmosets./AL Hartman, DS Powell, LM Bethel, et al.//J Virol. -2014.-88.-P. 2235–2245.
273. **Hause BM, Colin EA**, Liu R, Sheng Z, LuW Characterisation of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the *Ortomixoviridae* family. MBio.-2014.-5,2:e00031-14
274. **I. Bakr Helal**, M. Hassan ElMehalawy, Essam Hassan Ibrahim Cloning,Expression and Purification of Rift Valley Fever Virus Recombinant G2 Protein in Bacterial System //Journal of Medical Research Institute JMRI.- 2007.- 28 (3).-P. 281-91.
275. **Heise, M. T.** An alphavirus replicon-derived candidate vaccine against Rift Valley fever virus./Heise, M. T., A. Whitmore, J. Thompson, M. Parsons, et al. //Epidemiol Infect -2009.-137.-P. 1309-1318.
276. **Henderson, L. M.** Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology.// Biologicals.- 2005.-33.-P. 203-209.
277. **Herczeg, J. E.** Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe./Herczeg, J., E. Wehmann, R. R. Bragg et al.//Arch. Virol.- 1999.-144.-P.2087-2099.
278. **Hines N. L.**, C. L Miller Avian Paramixovirus serotype-1: review of disease distribution,clinical symptoms and laboratory diagnostics//Veterinary medicine international volume .-2012.- 17 p. doi:101155/2012/708216
279. **Holman, D. H.**, A complex adenovirus-vectored vaccine against Rift Valley fever virus protects mice against lethal infection in the presence of preexisting vector immunity./D. H., Holman, A. Penn-Nicholson, D. Wang et al.//Clin Vaccine Immunol - 2009.-16.-P. 1624-1632.
280. **Holmes E**, Ghedin E, Miller N. Whole-genome analysis of human influenza virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses// PLoS Biol.-2005.-3(9).-P. 1579-1589
281. **Hoshino A.** Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells / A Hoshino, K Fujioka, T Oku, et al.//Microbiology and immunology -2004.-48 (12).-P. 985-994
282. **Hovav AH.**Rapid memory CD8 T-lymphocyte induction through priming with recombinant DNA/AH.Hovav, MJ. Cayabyab, MW. Panas et al.//J.Virol.-2007.-81.-P.74-83
283. **Huang Z.**, Elankumaran S., Panda A., Samal S. K(). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector.//Poult Sci 2003.-82.-P. 899-906.

284. **Hubbard KA** Ability of a mutagenized virus variant to young lambs from RVF//Am. J.Vet Sci.-1991.-52.-P.50-55
285. **Huiskonen, J. T., A. K. Overby, F. Weber K.** 5Electron cryo-microscopy and single-particle averaging of Rift Valley fever virus: evidence for GN-GC glycoprotein heterodimers. //J Virol -2009.-83.-P. 3762-3769.
286. **Human** infection with influenza A(H7N9) in China Ecrit par WHO/05 Avril 2013. Режим доступа <http://www.cadureso.com/actualite/57-communique-presse/3468>
287. **Hunter, P., B. J. Erasmus, J. H. Vorster** Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep. //Onderstepoort J Vet Res -2002.-69.-P. 95-98.
288. **Ihara T., Akashi H., and Bishop D. H.** Novel euroasian highly pathogenic avian influenza a H5 virus in wild birds USA, 2014. //Emerg.Infect.dis.-2015.-21(3).-P.886-890.
289. **Ikegami, T.; Won, S.; Peters, C.J.** Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. //J. Virol. -2006.- 80.-P. 2933–2940.
290. **Ikegami, T. S. Makino** Rift valley fever vaccines.//Vaccine -2009-27 (14).-P. 69-72.
291. **Ikegami, T., K. Narayanan, S. Won** Rift Valley fever virus NSs protein promotes post-transcriptional downregulation of protein kinase PKR and inhibits eIF-2alpha phosphorylation.// PLoS Pathog -2009.-5: e1000287.
292. **Ikegami T., Makino S.** The pathogenesis of Rift Valley fever. //Viruses -2011.-3.-P. 493-519.
293. **Imam I. Z., El-Karamany R., and Darwish M. A.** An epidemic of Rift Valley fever in Egypt. 2. Isolation of the virus from animals. //Bull World Health Organ -1979.-57.-P.441-443.
294. **Indran SV, Ikegami T** Rift Valley fever virus MP-12 vaccine encoding Toscana virus NSs retains neuroinvasiveness in mice. //J Gen Virol – 2013.- vol. 94(7).-P. 1441-1450.
- Iranpour, M.; Turell, M.J.; Lindsay, L.R. Potential for Canadian mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus.//J. Am. Mosq. Control Assoc.-2011.- 27.-P. 363–369.
295. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).** Virus taxonomy: 2013 list Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. http://ictvonline.org/virus_taxonomy. EC 45, Edinburg, July 2013.
296. **Isin B.** Functional motions of influenza virus hemagglutinin: structure-based analytical approach./Isin B., Briker P., Bahar I.//Biophys J.-2002.-v.82(2).-P.569-581
297. **Jakel S., Eiden M., Balkema-Buschmann A** novel indirect ELISA based on glycoprotein Gn for detection of IgG antibodies against RVF virus in small ruminants.//Res. Vet.Sci.- 2013.-95(2).-P.725-730.
298. **Jakel S.** Generation monoclonal antibodies specific for Gn, N and Nss proteins of Rift Valley Fever Virus /Jäckel S, Eiden M, Dauber M, Balkema-Buschmann A, Brun A, Groschup MH.//Arch Virol. -2014.- 159(3).-P. 535-46.

299. **Jiang WM**, Wang SC, Peng C, Yu JM, Zhuang QY, HouGY Identification of potential novel type of influenza virus D in bovine in China. //Virus Genes.-2014.-49.-P. 493-496
300. **Jansen van Vuren P**. Evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus subunit nucleocapsid protein as an immunogen in mice and sheep.//The Open Vaccine Journal - 2010.-3.-P. 114-26.
301. **Jansen van Vuren P.**, Potgieter A. C., Paweska J. T. Preparation and evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus N protein for the detection of IgG and IgM antibodies in humans and animals by indirect ELISA.//J Virol Methods -2007.-140.-P.106-114.
302. **Jeanmaire E. M.**,. Prevalence of Rift Valley fever infection in ruminants in Madagascar after the 2008 outbreak./ Jeanmaire E. M., Rabenarivahiny R., Biarmann M., et al. //Vector Borne Zoonotic Dis. -2011.-11.-P. 395-402.
303. **Johnson, J. E.**, W. Chiu Structures of virus and virus-like particles.//Curr Opin Struct Biol.- 2000.-10.-P. 229-235.
304. **Jupp P. G**. The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies./P. G. Jupp, A.Kemp, A. Grobbelaar, P Lemaet al.//Med Vet Entomol. - 2002.-16.-P.245-252.
305. **Jupp PG**. et al. Experimental detection of Rift Valley fever virus by reverse transcription-polymerase chain reaction assay in large samples of mosquitoes.//J. Med. Entomol. -2000.-37.-P.467–471.
306. **Kahlon S. S**. Severe Rift Valley fever may present with a characteristic clinical syndrome./Kahlon S. S., Peters C. J., Leduc J.et al.// Am J Trop Med Hyg -2010.-82.-P.371-375.
307. **Kalveram B., Lihoradova O., and Ikegami T**. NSs protein of Rift Valley fever virus promotes posttranslational downregulation of the TFIIF subunit p62. //J Virol.- 2011.-85.-P.6234-6243.
308. **Kakach L. T., Wasmoen T. L., and Collett M. S**. Rift Valley fever virus M segment: use of recombinant vaccinia viruses to study Phlebovirus gene expression. //J Virol.- 1988.-62.-P.826-833.
309. **Kamal S. A**. Pathological studies on postvaccinal reactions of Rift Valley fever in goats. //Virol J 2009.-6.-P. 94-99.
310. **Kaushik DR**. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with OMP 28 adjuvanted with CpG oligonucleotide/ D.R. Kaushik, Singh DK, Kumar S.V. et al.//Vet. Res. Commun.-2010.-Vol.34(2).-P.119-132.
311. **Karen L**. Mansfielda, Ashley C. Banyarda, Lorraine McElhinneya, Nicholas Johnsona, Daniel L. Hortonc, Luis M. Hernández-Trianaa, Anthony R. Fooksa Rift Valley fever virus: A review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe//Vaccine.- 2015.- 33.- P. 5520–5531 _
312. **Kark J. D.**, Aynor Y., and Peters C. J.A Rift Valley fever vaccine trial: 2. Serological response to booster doses with a comparison of intradermal versus subcutaneous injection. //Vaccine -1985.-3.-P.117-122.

313. **Kasari TR**, Carr DA., Lynn TV., Weaver JT. Evaluation of pathways for release of Rift Valley fever virus into domestic ruminant livestock, ruminant wildlife, and human populations in the continental United States.//J Am Vet Med Assoc -2008.-232.-P. 514–529.
314. **Kasinrerk W.**, Moonsom S., Chawansuntati K. Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization route//Hybridoma and Hybridomic.-2002.-v.21.-P.287-293.
315. **Kennett R G** Monoclonal antibodies. Hybrid myelomas - a revolution in serology and immunogenetics //Am J Hum Genet. -1979 -Sep; 31(5).-P. 539–547.
316. **Keegan K. and Collett M. S.** Use of bacterial expression cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus.// J Virol.- 1986-58.-P.263-270.
317. **Kehm R.** Expression of immunogenic Puumala virus nucleocapsid protein in transgenic tobacco and potato plants. Kehm R., Jakob N. J., Welzel T. M./ Virus Genes - 2001.-22.-P. 73-83.
318. **Kennedy NJ.** DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy/NJ.Kennedy, TW Spithill,J.Tennent//Vaccine.-2006.-24.-P.970-979
319. **Kido H.**, Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure./H Kido, Jkumura Y., Takanashi E.//Biochim.Biophys Acta.-2012.-1824(1).-P. 186-194
320. **Kim J. J.** Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccination in rhesus macaques through the use of IL-2, IFN- γ , or IL-4 gene adjuvants/J. J. Kim, Joo-Sung Yang, Kelledy H. Manson, David B. Weiner//Vaccine -2001.-19.-P.2496 – 2505
321. **Kim LM**, Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates/Kim LM, King DJ, Curry PE, et al.//J. Virol. -2007.-81(22).-P. 12641–12653.
322. **Kim LM** Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using multiplex real-time PCR assay/Kim LM,DL Suarez, CL Afonso// J Vet Diagn Invest.-2008.-20,4.-P.414-425
323. **Kim JI**, Park MS N-linked glycosylation in the hemagglutinin of influenza A viruses/Yonsei Med J.-2012.-53. P.885-893
324. **KimShin-Hee** Novel Newcastle Disease Virus Strain Isolated from a Chicken in West Africa/ KimShin-Hee, S. Nayak, A. Palduraiet al.//Virol. 2012.-86(20).-P. 11394–11395. doi: 10.1128/JVI.01922-12 PMCID: PMC3457136
325. **Kim D**, Huey D, Oglesbee M, Niewiesk S. Insights into the regulatory mechanism controlling the inhibition of vaccine-induced seroconversion by maternal antibodies.//Blood.- 2011.-117.-P. 6143–51.

326. **Kim D**, Niewiesk S. Synergistic induction of interferon α through TLR-3 and TLR-9 agonists stimulates immune responses against measles virus in neonatal cotton rats.//*Vaccine*, 2014.- 32(2).-P. 265–70. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.013
327. **Klinman, D. M.**, G. Yamshchikov, Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines.//*J Immunol.* -1997.-158.- P. 3635-3639.
328. **Köhler G.**, C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.// *Nature* -1975.-256.-P.495-497.
329. **Kongkasuriyachai D.** Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine candidates evaluation homo and heterologous antigen-delivery prime-boost strategy/D Kongkasuriyachai, L.Bartels-Andrews, A Stowers et al.//*Vaccine*.- 2004.-22(23-24).-P.3205-13.
330. **Korn T.**, Bettelli E., Oukka M. IL-17 and Th17 Cells.//*Annu Rev Immunol* -2009.-27.-P. 485-517.
331. **Kortekaas J.** Creation of a nonspreading Rift Valley fever virus.//J.Kortekaas, Oreshkova N., Cobos-Jimenez V.et al. //*J Virol*,- 2011.-85.-P.12622-12630.
332. **Kortekaas J.** One Health approach to Rift Valley fever vaccine development.//*Antiviral Res.*- 2014.-106.-P. 24–32.
333. **Kortekaas J.**, de Boer S. M. Rift Valley fever virus immunity provided by a paramyxovirus vaccine vector. //*Vaccine* -2010.-28.-P.4394-4401
334. **Kortekaas J.** Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep/Kortekaas J., Antonis A. F., Kant J.et al. //*Vaccine* -2012.-30.-P.3423-3429.
335. **Koup RA**, Douek DC Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses.// *Cold Spring Harb Perspect Med* -2011.-1: a007252.
336. **Kreig A.M.** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects//*Annu. Rev.Immunol.*-2002.-20.-P.709-760
337. **Kumar H.**, Kawai T., and Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system.//*Int Rev Immunol* -2011.-30.-P.16-34.
338. **Kutzler M. A.**, Weiner D. B. DNA vaccines: ready for prime time? //*Nat Rev Genet* -2008.-9.-P.776-788.
339. **LaBeaud A. D.**, Kazura J. W., and King C. H. Advances in Rift Valley fever research: insights for disease prevention.// *Curr Opin Infect Dis* -2010.-23.-P. 403-408.
340. **LaBeaud A. D.** Rift Valley fever virus infection in African buffalo (*Syncerus caffer*) herds in rural South Africa: evidence of interepidemic transmission.//LaBeaud A. D., Cross P. C., Getz W. et al.//*Am J Trop Med Hyg* .-2011.- 84(4).-P. 641-646.
341. **LaBeaud A. D.** Interepidemic Rift Valley fever virus seropositivity, northeastern Kenya. /LaBeaud A. D., Muchiri E. M., Ndzovu M. et al.//*Emerg Infect Dis* -2008.-14.-P. 1240-1246.
342. **La Beaud A. D.** Postepidemic analysis of Rift Valley fever virus transmission in northeastern Kenya: a village cohort study.//La Beaud A. D., Muiruri S., Sutherland L. J. et al.//*PLoS Negl Trop Dis* -2011.-5:e1265.

343. **Lafon M.**, Use of a monoclonal antibodies for quantitation of rabies vaccine glycoprotein by ELISA/Lafon M., Perrin P., Versmisse p. et al.//J.Biol. Stand.-1985.-v.13(4).-P.-295-301
344. **Lagerqvist N**, Näslund J, Lundkvist Å, Bouloy M, Ahlm C, Bucht G. Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with RiftValleyFever virus cDNA constructs. //Virol. J.-2009.-6.-P.6-12.
345. **Lagerqvist N**. Stability of a formalin-inactivated Rift Valley fever vaccine: Evaluation of a vaccination campaign for cattle in Mozambique./Lagerqvist N., Moiane B., Bucht G et al.//Vaccine.- 2012.- 30.-P. 6534-6540.
346. **Laughlin LW**, Girgis NI, Meegan JM, Strausbaugh LJ, Yassin MW, Watten RH. Clinical studies in Rift Valley fever. Part 2: Ophthalmologic and central nervous system complications.//J Egypt Public Health Assoc 1978.-53.-P.182-4.
347. **Laidlaw B. J.** Cooperativity Between CD8+ T Cells, Non-Neutralizing Antibodies, and Alveolar Macrophages Is Important for Heterosubtypic Influenza Virus Immunity/B. J. Laidlaw, V. Decman, Mohammed-Alkhatim A. Ali, M. C. Abt, A. I. Wolf, L. A. Monticelli, K. Mozdzanowska// Published: March 14, 2013 DOI: 10.1371/journal.ppat.1003207.
348. **Lernout T**, Cardinale E, Jegu M, Desprès P, Collet L, Zumbo B, Tillard E, Girard S, Filleul L. Rift Valley fever in humans and animals in Mayotte, an endemic situation.//PLoS One.- 2013.-30.-8(9):e74192
349. **Lecherog S**. Enhanced efficacy of DNA vaccines against an intracellular bacterial pathogen by genetic adjuvants/S. Lecherog, JS. Harms, SC. Oliveira//Curr. Pharmaceutic.-2003.-4(2).-P.99-107
350. **Leifert JA**. Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways/JA. Leifert, MP. Rodriguez-Carreno, F. Rodriguez et al.//Immunl Rev.-2004.-199.-P.40-53
351. **Leuridan E**, Hens N, Hutse V, Aerts M, Van Damme P. Kinetics of maternal antibodies against rubella and varicella in infants.//Vaccine.- 2011.- 29.-P.2222-2226.
352. **Le May, N**. A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells./Le May, N., Z. Mansuroglu, P. Leger, //PLoS Pathog. -2008.-4: e13.
353. **Le Roux CA**. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens./CA Le Roux, T Kubo, AA Grobbelaar, et al.//J Clin Microbiol - 2009.-47.-P.645-651
354. **Levine M. M**. "IDEAL" vaccines for resource poor settings. Vaccine 29 Suppl 4:D116-125//Emerg Infect Dis. -2012- 18(6).-P.963-965.
355. **Lichoti J.K**, Kihara A, Oriko AA, Okutoyi LA, Wauna JO, Tchouassi DP, Tigoi CC, Kemp S, Sang R, Mbabu RM. Detection of Rift Valley fever virus interepidemic activity in some hotspot areas of Kenya by sentinel animal surveillance, 2009-2012.//Vet Med Int. -2014.-2014.-379010.

356. **Li Zhao** Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus, Shandong Province, China/Li Zhao, Shenyong Zhai, Hongling Wen, Feng Cui, Yuanyuan Chi, et al.// *Emerg Infect Dis.*- 2012.- 18(6).-P. 963–965.
357. **Li Z.**, Yin X., Yi Y., Li X., Li B., Lan X., Zhang Z., Liu J. FMD subunit vaccine produced using a silkworm-baculovirus expression system: protective efficacy against two type Asia1 isolates in cattle. // *Vet Microbiol* -2011.-149.-P. 99-103
358. **Lindh E, et al.** Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland *Virol. J.*-2008.- 5.- P.35-43.
359. **Lindh E.** Molecular epidemiology of outbreak associated and wild-waterfowl-derived Newcastle disease virus strains in Finland, including a novel class I genotype./Lindh E, Ek-Kommonen C, Väänänen VM.// *J. Clin. Microbiol.* -2012.-50(11).- P. 3664–3673.
360. **Linthicum K. J., Davies F. G., Kairo A.** Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. // *J Hyg (Lond)* -1985 -95.-P.197-209.
361. **Linthicum, K. J., A. Anyamba, C. J. Tucker** Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya.// *Science* -1999.-285.-P. 397-400.
362. **Liu, L., C. C. Celma, P. Roy** Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins.// *Virol J* - 2008.-5.- P. 82-90.
363. **Liu Y. L.**, Generation of a velogenic Newcastle disease virus from cDNA and expression of the green fluorescent protein./Liu Y. L., Hu S. L., Zhang Y. M. et al.// *Arch Virol.*- 2007.-152.-P. 1241–1249.
364. **Liu XF, Wan HQ, Wu YT** Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during -1985–2001.// *Arch Virol* -2003.-148.-P. 1387–1403
365. **Liu M. A., Wahren B., Karlsson Hedestam G. B.** DNA vaccines: recent developments and future possibilities.// *Hum Gene Ther* -2006.-17.-P. 1051-1061.
366. **Liu H., Y. Zhao, D. Zheng et al.** Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses/ Liu H., Y. Zhao, D. Zheng et al.// *J Virol Meth.*-2011.-v.171,1.-P.149-155
367. **Lodmell DL, Ewalt LC** Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA, inactivated virus, or recombinant vaccinia// *Vaccine.*-2000.-18.-P.2394-2398
368. **Lomniczi B, et al .** Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII).// *Arch. Virol.*-1998.- 143.-P. 49–64.
369. **Lopez, N. Muller, Bouloy M.** The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. // *J Virol.* - 1995.-69.-P.3972-3979.
370. **Lopez-Gil E.** A singl immunization with MVA expressing GnGc glycoproteins promotes epitope-specific CD8+T cell activation and protects immune-competent mice

- against a lethal RVFV infection./ E. Lopez-Gil, Lorenzo G., Hevia E. et al. //PLOS Negl Trop Dis.-2013.- 7:e2309
371. **Lorenzo G.**, Martin-Folgar R., Boshra H. Protection against lethal Rift Valley fever virus infection in transgenic IFNAR(-/-) mice induced by different DNA vaccination regimens.// Vaccine -2010.-28.-P.2937-2944.
372. **Lorenzo G.**, Martin-Folgar R., Rodriguez F. Priming with DNA plasmids encoding the nucleocapsid protein and glycoprotein precursors from Rift Valley fever virus accelerates the immune responses induced by an attenuated vaccine in sheep. //Vaccine - 2008.-26.-P. 5255-5262.
373. **Lowry O. H.** Protein measurement with the Folin phenol reagent.//J.Biol. Chem. - 1951.-v.193.-P.265-275.
374. **Lu, S.** Heterologous prime-boost vaccination. //Curr Opin Immunol -2009.-21.- P. 346-351.
375. **Lvov DK** Evolution of HPAIV H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia (2005-08)/ DK. Lvov, MY.Shchelkanov, AG. Prilipov et al.//Avian.Dis.-2010.- 54(1).-P.483-495
376. **MacMillan S.** Could RVF be a weapon of mass destruction An insidious insect-animal-people infection loop explored//Poster on 12 Feb. 2012
377. **Madani T. A.**, Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics.//Clin Infect Dis -2003.-37.-P.1084-1092.
378. **Malek TR.** The biology of interleukine-2/TR. Malek, Madani T. A., Al-Mazrou Y. Y. et al. //Annual review of immunology.-2008.-26.-P.453-479
379. **Mandell R. B.** A replication-incompetent Rift Valley fever vaccine: Chimeric virus-like particles protect mice and rats against lethal challenge./Mandell R. B., R. Koukuntla, et al.//Virology -2009.-397(1).-P. 187-198.
380. **Mandell R. B., Flick R.** Rift Valley fever virus: a real bioterror threat.//J Bioterr Biodef -2011.- 2.-P. 108-115.
381. **Mandell R. B.** A replication-incompetent Rift Valley fever vaccine: chimeric virus-like particles protect mice and rats against lethal challenge./Mandell R. B., Koukuntla R., et al.// Virology -2010.-397.-P. 187-198.
382. **Mandell R. B.** Novel suspension cell-based vaccine production systems for Rift Valley fever virus-like particles./Mandell R. B., Koukuntla R., Mogler L. J., et al. //J Virol Methods- 2010.-169.-P. 259-268.
383. **Mansuroglu, Z.** Non structural NSs protein of Rift Valley Fever Virus interacts with pericentromeric DNA sequences of the host cell inducing chromosome cohesion and segregation defects./ Z.Mansuroglu, T. Josse J. Gilleron et al.// J Virol. -2009.-83.- P. 10495-10500.
384. **Markowska-Daiel I,** Kwit K, Urbaniak K, Kowalczyk A//Serological evidence of co-circulation different subtypes of swine influenza virus in Polish pig herda//Bull. Veter.Inst.in Pulawy.-2012.-56,4.-P.425-429
385. **Marsh M., Helenius A.** Virus entry: open sesame.//Cell.- 2006.-124.-P.729-740.

386. **Marrack P.** Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium./Marrack P., McKee A. S., Munks M. W.//*Nat Rev Immunol* -2009.-9.-P.287-293.
387. **Matrosovich MN**, Krauss S, Webster R H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity.//*Virology*.- 2001- 281(2).-P.156-162.
388. **Matsuoka Y.**, Chen SY., Compans RW. A signal for Goldgi retention in the *Bunyaviridae* glycoprotein/Y.Matsuoka, SY. Chen, RW.Compans//*J. Biol. Chem.*-1994.-269.-P.22565-22573
389. **Maquart M.** Phylogeographic Reconstructions of a Rift Valley Fever Virus Strain Reveals Transboundary Animal Movements from Eastern Continental Africa to the Union of the Comoros /M Maquart, H Pascalis, S Abdouroihamaneet al.//*Transboundary and Emerg. Dis.*- 2014.-9; DOI: 10.1111/tbed.12267
390. McBratney S. Flu-like Symptoms: Causes//*Infections and Contagious Diseases* Режим доступа <http://www.localhealth.com/article/flu-like-symptoms/causes>
391. **McCauley JW.** Orthomyxoviridae, In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E (ed), *Virus taxonomy*/JW McCauley, S Hongo, NV Kaverinet al.//*Classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* -2012.- P. 749–761. NY.
392. **McConkey SJ.** Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans/ SJ. McConkey, WH Reece, VS Moorthy et al.//*Nat.Med.* -2003.-9(6).-P. 729–35
393. **McElroy A. K., Albarino C. G., Nichol S. T.** Development of a Rift Valley fever ELISA that can distinguish infected from vaccinated animals.//*Virol J.* -2009.-6.-P.125-134.
394. **Mena A**, Andrew ME,Coupar B.HRapid dessimination of intramuscularly inoculated DNA vaccines.//*Immunology and Cell Biology*.-2001.-79.-P. 87-89.
395. **Meegan J. M.** The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-78. 1. Description of the epizootic and virological studies. //*Trans R Soc Trop Med Hyg.*- 1979.-73.-P.618-623.
396. **Meegan J. M.**, Khalil G. M., Hoogstraal H. Experimental transmission and field isolation studies implicating *Culex pipiens* as a vector of Rift Valley fever virus in Egypt. //*Am J Trop Med Hyg* -1980.-29.-P. 1405-1410.
397. **Métrás R**, Collins LM, White RG, Alonso S, Chevalier V, et al. Rift Valley fever epidemiology, surveillance, and control: what have models contributed? /Métrás R, Collins LM, White RG et al.//*Vector Borne and Zoonotic Diseases* -2011.-11.-P.761–771
398. **Meyer B. J., Schmaljohn C. S.** Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms.// *Trends Microbiol.*- 2000.-8.-P.61-67.
399. **Miller PJ.** Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus./Miller PJ, Kim LM, Ip HS, Afonso CL.//*Virology*- 2009.-391(1).-P.64 –72.
400. **Miller B. R.** Isolation and genetic characterization of Rift Valley fever virus from *Aedes vexans arabiensis*, Kingdom of Saudi Arabia./B. R.Miller, Godsey M. S., Crabtree M. et al.//*Emerg Infect Dis.*- 2002.-8.-P. 1492-1494.

401. **Michells B.** Differentiation influenza and flu-like-diseases./ B. Michells, et al. //BMC Fam Pract.- 2011.- режим доступа www.rightdiagnosis.com/symptoms/flu_like_symptoms/common.htm
402. **Miller PJ., Decanini EL, Afonso CL.** Newcastle disease evolution of genotypes and the related diagnostic challenges.//Infection, genetic and evolution.-2010.-v.20(4).- P. 414-425.
403. **Miller PJ,** et al. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands.//J. Virol.- 2010.-84.-P. 11496–11504.
- 404.**Maengo D,** Lorenzo G, Iglesias J, Warigia M, Sang R, Bishop RP, et al. Detection and identification of Rift Valley fever virus in mosquito vectors by quantitative real-time PCR.//Virus Res.- 2012.-169.-P. 137–43.
405. **Mohamed M.** Epidemiologic and clinical aspects of a Rift Valley fever outbreak in humans in Tanzania, 2007/Mohamed M., Mosha F., Mghamba J. //Am J Trop Med Hyg - 2010.-83.-P.22-27.
406. **Montgomery D. L.** Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors/Montgomery D. L., Shiver J. W., Leander K. R., et al.//DNA Cell Biol.- 1993.-12.-P. 777-783.
407. **Moorthy VS.** Highly immunogenic prime-boost regiment, including a 12-month reboosting vaccination/V.S.Moorthy, EB Imoukhuede, S Keating et al//J.Infect.Dis.- 2009.-194.-P.2213-2219
408. **Mori H.** Expression of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus/Mori H., Tawara H., Nakamura K., et al. // Avian diseases -1994. – v.38,4.- P.772-774
409. **Morla S,** Kumar Tiwari A, Joshi V Complete genome sequence of a Newcastle disease virus isolate from an outbreak in northern India.//Genome Announc -2014.- 2(2):e00342-14. doi:10.1128/genomeA.00342-14
410. **Morrill J. C., Peters C. J.** Protection of MP-12-vaccinated rhesus macaques against parenteral and aerosol challenge with virulent Rift Valley fever virus. //J Infect Dis.- 2011.-204.-P.229-236.
411. **Morrill J. C.** Pathogenesis of Rift Valley fever in rhesus monkeys: role of interferon response./Morrill J. C., Jennings G. B., Johnson A. J. //Arch Virol -1990.-110.- P. 195-212.
412. **Morrill J. C., Mebus C. A., Peters C. J.** Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in cattle.// Am J Vet Res.- 1997.-58.-P. 1104-1109.
414. **Morrill J. C. and Peters C. J.** Mucosal immunization of rhesus macaques with Rift Valley fever MP-12 vaccine. //J Infect Dis.- 2011.-204.-P.617-625.
415. **Morrill J. C.** Safety and immunogenicity of recombinant Rift Valley fever MP-12 vaccine candidates in sheep./Morrill J. C., Laughlin R. C., Lokugamage N. et al.//Vaccine -2013.-31.-P. 559-565.

416. **Morrill J. C.** Rapid accumulation of virulent Rift Valley fever virus in mice from an attenuated virus carrying a single nucleotide substitution in the m RNA./Morrill J. C., Ikegami T., Yoshikawa-Iwata N. et al.//PLoS One -2010.-5:e9986.
417. **Morvan J.** Possible Rift Valley fever outbreak in man and cattle in Madagascar./Morvan J., Fontenille D., Saluzzo J. F. et al.//Trans R Soc Trop Med Hyg. - 1991.-85.-P.108-114.
418. **Moutailler, S., G. Krida, F. Schaffner, M. Vazeille & A. B. Failloux** Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region.//Vector Borne Zoonotic Dis.- 2008.-8.-P. 749-753.
419. **Muller R.** Completion of the genome sequence of Rift Valley fever phlebovirus indicates that the L RNA is negative sense and codes for a putative transcriptase replicase./Muller R., Argentini C., Bouloy M. et al.// Nucleic Acids Res.- 1991.-19.-P.5433-42.
420. **Murakami S,** Terasaki K, Ramirez SI, Morrill JC, Makino S. Development of a novel, single-cycle replicable Rift Valley fever vaccine.//PLoS Negl Trop Dis.- 2014.-8:e2746.
421. **Naderitu L,** Lee JS, Omolo J, O'Guinn ML, Hightower A, Mosha F, et al. Sequential Rift Valley fever outbreaks in Eastern Africa caused by multiple lineages of the virus.//J Infect Dis.- 2011.-203.-P. 655-65.
422. **Naslund J.** Kinetics of Rift Valley fever virus in experimentally infected mice using quantitative real-time RT-PCR./Naslund J., Lagerqvist N., Lundkvist A., et al.//J Virol Methods -2008.-151.-P.277-282.
423. **Neefjes J., Jongsma M. L., Paul P.** Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. //Nat Rev Immunol -2011.-11.-P.823-836.
424. **Nelson M.** Novel reassortant avian influenza A H7N9 virus what are the implications for Europe/ M. Nelson, AL Vincent, P Hitikoon, EC Holmes et al.//Euro Surveill.-2013.-18(15).-P. 20452-20454
425. **Nguku P. M.** An investigation of a major outbreak of Rift Valley fever in Kenya: 2006-2007./Nguku P. M., Sharif S. K., Mutonga D. et al.// Am J Trop Med Hyg -2010.-83.-P. 5-13.
426. **Nicholls J** Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy./J.Nicholls, Erin F., Robert E. W. et al.//Annals of the New York Academy of Sciences.-2010.-1213(1).-P.46-61
427. **Nichol L** Avian Paramyxoviridae Serotype-I: A Review/L. Nichol, Hines, CL Miller// Veterinary Medicine International Volume 2012 (2012), Article ID 708216, 17 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/708216>
428. **Nicolas G.A** Durand B, Rakotoarimanana TT, Lacote S, Chevalier V, Marianneau P. A 3-year serological and virological cattle follow-up in Madagascar highlands suggests a non-classical transmission route of Rift Valley fever virus.//Am J Trop Med Hyg. -2014.-90(2).-P. 265-6.

429. **Niklasson B.** Rift Valley fever: a sero-epidemiological survey among pregnant women in Mozambique./Niklasson B., Liljestrand J., Bergstrom S., Peters C. //J. Epidemiol Infect -1987.-99.-P. 517-522.
430. **Niklasson B.** Rift Valley fever virus vaccine trial: study of neutralizing antibody response in humans. /Niklasson B., Peters C. J., Bengtsson E.//Vaccine-1985.-3.-P. 123-127.
431. **Niu G** Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus among domesticated animals China/ G Niu et al.//Emerg.Infect.Dis.-2013.-19.-P.756-763
432. **Njenga M. K.** Using a field quantitative real-time PCR test to rapidly identify highly viremic Rift Valley fever cases./Njenga M. K., Paweska J., Wanjala R. et al.//J Clin Microbiol -2009.-47.-P.1166-1171.
433. **Noad, R.,** Roy P. Virus-like particles as immunogens.//Trends Microbiol -2003.-11.-P. 438-444.
434. **Nobusawa E.** Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinin of influenza A virus /Nobusawa E Aoyama T., Kato U et al.//Virology.-1991.- 182.-P.475-485
435. **Nofon C. K.** Innate immune response to Rift Valley fever virus in goats./Nofon C. K., Marszal P., Zhang S. et al.//PLoS Negl Trop Dis -2012.-6:e1623.
436. **Nokireki T.** The first detection of influenza in the Finnish pig population: a retrospective study/T. Nokireki, T. Laine, L. London//Acta Veter. Scand.-2013.-55.-P. 69-73.
437. **Offten GR.** Relative potency of cellular and humoral immune responses induced by DNA vaccination/GR.Offten, B.Doe, M. Schaefer et al.// Intervirology.-2000.-43.-P.227-232.
438. **O'Hagan DT.** Microparticles for the delivery DNA vaccines//Immunol.-2004.-199.-P.91-200.
439. **Olive M.-M.** Absence of Rift Valley Fever Virus in Wild Small Mammals, Madagascar/M-M.Olive, N. Razafindralambo, T. A. Barivelo, J.T. Rafisandratantsoa //Emerg Infect Dis. -2013.-19(6).-P.1025–1027.
440. **Orsag P.** Quantitative real-time PCR study on persistence of pDNA vaccine pVax-Hsp60 TM814 in beef muscles/Orsag P., V. Kvardjva., M. Raska et al.//J. Genet Vaccines Ther. -2008.- 2,6.-P. 11-17.
441. **Ordendaal L,** Fosgate GT, Romito M, Coetzer JA, Clift SJ. Sensitivity and specificity of real-time reverse transcription polymerase chain reaction, histopathology, and immunohistochemical labeling for the detection of Rift Valley fever virus in naturally infected cattle and sheep.//J Vet Diagn Invest.- 2014.-26.-P. 49–60.
442. **Overby A. K.** The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging./A. K.Overby, Pettersson R. F., and Neve E. P.// J Virol. -2007-81.-P. 3198-3205.
443. **Palese P,** Shaw ML. 2007. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, p 1647–1690. In Knipe D, Howley P (ed), Fields virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

444. **Pan Z.**, Zhang X., Geng S., Fang Q., You M. et al. Prime-boost immunization using a DNA vaccine delivery by attenuated *Salmonella enterica* serovar *Tiphimurium* and killed vaccine completely protects chickens from H5N1 highly pathogenic avian influenza virus./Z.Pan, Zhang X., Geng S., Fang Q., You M. et al.//Conical and vac Immunol -2010.-17(4).-P.518-523.
445. **Panda A.** Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus./A. Panda, Huang Z, Elankumaran S et al.//Microb Pathog -2004.-36.-P. 1–10.
446. **Papin J. F.** Recombinant Rift Valley fever vaccines induce protective levels of antibody in baboons and resistance to lethal challenge in mice./Papin J. F., Verardi P. H., Jones L. A., et al. //Proc Nat. Acad Sci U S A -2011.- 108.-P.14926-14931.
447. **Pascal M.**, Le Guyader H., Simberloff D. Biological invasions and conservation of biodiversity//Rev.sci. tech.off. int. //Epiz.-2010.-29(2).-P. 387-403
448. **Pasetti M. F.** Immunology of gut mucosal vaccines./Pasetti M. F., Simon J. K., Sztein M. B., and Levine M. M //Immunol Rev -2011.-239.-P.125-148.
449. **Paweska J. T.**, Mortimer E., Leman P. A., Swanepoel R. An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. //J Virol Methods -2005.-127.-P. 10-18.
450. **Paweska J. T.** Recombinant nucleocapsid-based ELISA for detection of IgG antibody to Rift Valley fever virus in African buffalo./J. T. Paweska, van Vuren P. J., Kemp A. et al.//Vet Microbiol -2008.-127.-P. 21-28.
451. **Peiris JS**, Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? /Peiris JS, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge KF //J. Virol. -2001.-75.-P.9679–9686.
452. **Peiris JS**, Tu WW., Yen YL., A novel H1N1 virus causes the first pandemic of the 21st century// Eur.J.Immunol.-2009.-39.-P.2946-2954
453. **Peng G**, Frequent occurrence of genetic reassortment between influenza C virus strains in nature./Peng G, Hongo S, Kimura H, Muraki Y, Sugawara K, Kitame F, et al.//J. Gen. Virol.- 1996.-77.-P. 1489–1492.
454. **Pepin M.**, Bouloy M., Bird B. H., Kemp A., and Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. //Vet Res -2010.-41.-P.61-70.
455. **Pedro BSP**, Telma AOC. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects.//Int J Infect Dis.- 2011.-15.-P. 366–76.
456. **Perozo F.**, R. Marcano, C. L. Afonso Biological and Phylogenetic Characterization of a Genotype VII Newcastle Disease Virus from Venezuela: Efficacy of Field Vaccination//J. Clin. Microbiol. April -2012. -50,4.-P. 1204-1208
457. **Peters C. J.**, Reynolds J. A., Slone T. W., Jones D. E., Stephen E. L. Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator./ Peters C. J., Reynolds J. A., Slone T. W. et al. //Antiviral Res - 1986.- 6.-P.285-297.

458. **Peterson N.C.** Advances in Monoclonal Antibody Technology: Genetic Engineering of Mice, Cells and Immunoglobulins. // ILAR Journal- 2005.- V. 46.- P. 314-319.
459. **Philippe, B.**; Jouan, A.; Riou, O.; Coulibaly, I.; Leguenno, B.; Meegan, J.; Mondo, M.; Digoutte, J.P. Hemorrhagic forms of Rift Valley fever in Mauritania. //Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales -1989.-82.-P. 611–619.
460. **Pichlmair A.**, Habjan M., Unger H., and Weber F. Virus-like particles expressing the nucleocapsid gene as an efficient vaccine against Rift Valley fever virus. //Vector Borne Zoonotic Dis -2010-10.-P. 701-703.
461. **Pica N, Palese P.** Toward a universal influenza virus vaccine: prospects and challenges.//Annu Rev Med. -2013.-64.-P. 189-202.
462. **Piper M. E.**, Sorenson D. R., and Gerrard S. R. Efficient cellular release of Rift Valley fever virus requires genomic RNA.// PLoS One -2011-6:e18070.
463. **Pittman P. R.**, Liu C. T., Cannon T. L., Makuch R. S., Mangiafico J. A., Gibbs P. H., and Peters C. J. Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience. //Vaccine -2000.-18.-P. 181-189.
464. **Pittman, P.R.**; Rift Valley fever MP-12 vaccine Phase 2 clinical trial: Safety, immunogenicity, and genetic characterization of virus isolates./P.R. Pittman; Norris, S.L.; Brown, E.S.; Ranadive, M.V. et al.//Vaccine.-2016.- 34.-P. 523–530.
465. **Pontecorvo G.** Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. // Somat. Cell Genet.- 1975.-1.- P.397-400
466. **Prado, I.**, D. Rosario, L. Bernardo, M. Alvarez, R. Rodriguez, S. Vazquez, M. G. Guzman PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. J Virol Methods -2005-125.-P. 75-81.
467. **Polewicz M.**, Gracia A, Garlapati S, Van Kessel J, Strom S, Halperin SA, et al. Novel vaccine formulations against pertussis offer earlier onset of immunity and provide protection in the presence of maternal antibodies.//Vaccine.- 2013.- 31.-P. 3148–55.
468. **Rakotoarivelo RA**, Andrianasolo R, Razafimahefa SH, Randremandranto Razafimbelo NS, Randria MJ. Severe presentations of Rift Valley Fever in Madagascar/ RA Rakotoarivelo, R Andrianasolo, SH Razafimahefa et al.// Med Mal Infect.- 2011.- 41(6).-P. 318-21.
469. **Rabinowitz P** Animal as sentinel of bioterrorism agent//Emerg. Infect.dis.-2006-12.-P.647-652
470. **Radosevic, K.**, A. Rodriguez, A. Lemckert, J. Goudsmit Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects. //Expert Rev Vaccines -2009-8.-P. 577-592.
471. **Rajcani J.**, Mosko T., Rezuchova I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved?// Rev Med Virol.- 2005-15.-P. 303-325.
472. **Ramachandran A.**, Horvath C.M. Paramyxovirus disruption of interferon signal transduction: STATus report.//J. Interferon Cytokine Res. -2009.-29(9).-P.531–537.
474. **Randall R.**, Binn L. N., and Harrison V. R. Immunization against Rift Valley fever virus. Studies on the immunogenicity of lyophilized formalin inactivated vaccine. //J Immunol.- 1964.-93.-P.293-299.
475. **Randall R.**, Gibbs C. J., Aulisio C. G., Binn L. N., and Harrison V. R.(). The development of a formalin-killed Rift Valley fever virus vaccine for use in man.// J Immunol.- 1962.-89.-P.660-671.

476. **Randall R.E.**, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus counter measures. *J. Gen. Virol.* - 2008.-89 (1).-P. 1–47.
477. **Ratovonjato J.**, et al. Detection, isolation, and genetic characterization of Rift Valley fever virus from *Anopheles (Anopheles) coustani*, *Anopheles (Anopheles) squamosus*, and *Culex (Culex) antennatus* of the Haute Matsiatra region, Madagascar. //Vector Borne Zoonotic Dis.- 2010 doi:10.1089/vbz.2010.0031
478. **Raymond D. D.**, Piper M. E., Gerrard S. R., and Smith J. L. Structure of the Rift Valley fever virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation. //Proc Natl Acad Sci U S A -2010.-107.-P.11769-11774.
479. **Reading S. A. and Dimmock N. J.** Neutralization of animal virus infectivity by antibody. //Arch Virol -2007.-152.-P.1047-1059.
480. **Reguera J.**, Weber F., Cusack S. Bunyaviridae RNA polymerases (L protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. //PLoS Pathog.- 2010.-6:e1001101.
481. **Reguera, J.**; Cusack, S.; Kolakofsky, D. Segmented negative strand RNA virus nucleoprotein structure.//Curr. Opin. Virol.-2014.- 5.- P.7–15.
482. **Rich K. M., Wanyoike F.** An assessment of the regional and national socio-economic impacts of the 2007 Rift Valley fever outbreak in Kenya.//Am J Trop Med Hyg -2010.-83.-P.52-57.
483. **Rift Valley fever** in: Sunit K. Singh Human emerging and re- emerging infection - 2015.-P.77-98.
484. **Rodriguez F.**, An L. L., Harkins S., Zhang J., Yokoyama M., Widera G., Fuller J. T., Kincaid C., Campbell I. L., and Whitton J. L. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination.// J Virol.- 1998.-72.-P.5174-5181.
485. **Rodriguez-Moran P.**, Kelly C., Williams T. M., and Hjelle B. Hantavirus infection in the Four Corners region of USA in 1998.//Lancet.-1998.- 352.-P.1353.
486. **Rodhain, F.** Aedes albopictus: a potential problem in France. //Parassitologia.- 1995.- 37.-P.115–119.
487. **Roger M.** Evidence for Circulation of the Rift Valley Fever Virus among Livestock in the Union of Comoros./ M. Roger, M. Beral, S. Licciardi, M. Soulé, A. Fahaoudine, et al.//PLoS Negl Trop Dis.- 2014.-8(7):e3045.
488. **Roiz D.** Climatic factors driving invasion of the tiger mosquito (Aedes albopictus) into new areas of Trentino, northern Italy./D Roiz, M Neteler, C Castellani, D Arnoldi, A Rizzoli//PLoS ONE -2011.-6.-P.1–8
489. **Roldao A.**, Mellado M. C., Castilho L. R., Carrondo M. J., and Alves P. M. Virus-like particles in vaccine development. //Expert Rev Vaccines -2010.-9.-P.1149-1176.
490. **Rolin A. I.** The risk of Rift Valley fever virus introduction and establishment in the United States and European Union/A. I Rolin1, L. Berrang-Ford1 M. A Kulkarni//Emerging Microbes & Infections -2013- 2e81; doi:10.1038/emi.2013.81
491. **Ross T. M.**, Bhardwaj N., Bissel S. J., Hartman A. L., and Smith D. R. Animal models of Rift Valley fever virus infection.//Virus Res -2012.-163.-P.417-423.

492. **Rossi C. A.,**and Turell M. J. Characterization of attenuated strains of Rift Valley fever virus.//J Gen Virol. -1988.-69.-P.817-823.
493. **Ruzila A.Yu.,** Tissue distribution of intramuscularly and intratumorally administered DNA plasmid/A.Yu.Ruzila, V.L., Leenathul N.A., Nik-Mohd-Afizan N.A. et al.//Afric.J.Pharmacy Pharmacology.-2010.-v.4(11).-P.775-782.
494. **Rusnak J. M.,** Gibbs P., Boudreau E., Clizbe D. P., Pittman P. Immunogenicity and safety of an inactivated Rift Valley fever vaccine in a 19-year study.//Vaccine -2011-29.-P.3222-3229.
495. **Russell R.** Survival of insects in the wheel bays of a Boeing 747B aircraft on flights between tropical and temperate airports.//Bull World Health Organ -1987.- 65.- P.659–662
496. **Rusu M.** An assembly model of Rift Valley fever virus./Rusu M., Bonneau R., Holbrook M. R. et al.//Front Microbiol -2012.-3.-P. 254-59.
497. **Sabin, A. B.** Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses./Sabin, A. B., M. Ramos-Alvarez, J. Alvarez-Amezquita et al.//JAMA -1960.-173.-P. 1521-1526.
498. **Saira K.** Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus./Saira K, Lin X, Depasse JV, Halpin R, et al.// J. Virol.- 2013.-87.-P. 8064–8074.
499. **Saira K.** Global Influenza Programme, 2013 //Режим доступа <http://www.who.int/topics/influenza/en/>
500. **Sall A. A.** Genetic reassortment of Rift Valley fever virus innature./Sall A. A., Zannotto P. M., Sene O. K. et al.//J Virol.- 1999.-73.-P.8196-8200.
501. **Sall A.** Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera./Sall A. A., Thonnon J., Sene O. K. et al.// J Virol Methods.- 2001.-91.-P. 85-92.
502. **Salk, J. E.** Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress.// J Am Med Assoc.- 1953.-151.-P. 1081-1098.
503. **Saif YM.,** Fadly AM., Glisson JR., McDougald LR. Newcastle disease, other avian paramixoviruses and pneumovirus infection//in Diseases of Poultry pp75-93, Black well Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, 12th edition, 2008
504. **Saluzzo J. F., Smith J. F.** Use of reassortant viruses to map attenuating and temperature-sensitive mutations of the Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. //Vaccine -1990.-8.-P. 369-375.
505. **Samuel C. E.** Antiviral actions of interferons. //Clin.Microbiol. Rev. -2001.-14.-P. 778-809.
506. **Samulowitz U.** Novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon inductionwith preferred structural properties/U. Samulowitz,Weber M., Weeranta R., Uhlmann E. et al. //Oligonucleotides.-2010.-Vol.20(2).- P.93-101.

507. **Sandie R.** Predicting the emergence of influenza virus reveals contracted mode of evolution of HA and NA antigens//J. Mol. Evol.-2014.- 78.-P.1-12
508. **Sang R,** Kioko E, Lutomiah J, Warigia M, Ochieng C, O'Guinn M, et al. Rift Valley fever virus epidemic in Kenya, 2006/2007: the entomologic investigations.//Am J trop Med Hyg.- 2010.-83.-P. 28–37.
509. **Scheerlinck J-PY.** Genetic adjuvants for DNA vaccines//Vaccine.-2001.-19.-317(19).-P.2647-2656
510. **Sautto G.** Possible Future Monoclonal Antibody (mAb)-Based Therapy against Arbovirus Infections /G. Sautto, N. Mancini, G. Gorini, M. Clementi, R. Burioni //BioMed Research International Volume -2013, Article ID 838491, 21 p. Режим доступа <http://dx.doi.org/10.1155/2013/838491>
511. **Senne DA, et al.** Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. //Avian Dis. -1996.-40.-P. 425–437.
512. **Sherman M. B.** Single-particle cryo-electron microscopy of Rift Valley fever virus./Sherman M. B., Freiberg A. N., Holbrook M. R. et al.//Virology -2009.- 387.-P.11-15.
513. **Shi X.** Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis./Shi X., Kohl A., Li P., Elliott R. M.//J Virol. -2007.-81.-P. 10151-10160.
514. **Shieh W. J.** Pathologic studies on suspect animal and human cases of Rift Valley fever from an outbreak in Eastern Africa, 2006-2007./Shieh W. J., Paddock C. D., Lederman E., et al. // Am J Trop Med Hyg.- 2010.-83.-P. 38-42.
515. **Schmaljohn C.** Prospects for vaccines to control viruses in the family Bunyaviridae. //Reviews in Medical Virology.- 1994.-4.-P. 185-196.
516. **Schmaljohn C. S.** Baculovirus expression of the M genome segment of Rift Valley fever virus and examination of antigenic and immunogenic properties of the expressed proteins. /Schmaljohn C. S., Parker M. D., Ennis W. H., et al.//Virology -1989.-170.-P.184-192.
517. **Schreur P.J.W.,** Kortekaas Single-Molecule FISH Reveals Non-selective Packaging of Rift Valley Fever Virus Genome Segments//Plos: -2016 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005800>.
518. **Shoemaker T.** Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen, -2000-01./Shoemaker T., Boulianne C., Vincent M. J et al.// Emerg Infect Dis -2002.-8.-P.1415-1420.
519. **Schroder K.** Interferon gamma: an overview of signals, mechanisms and functions./Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A //J Leukoc Biol.- 2004.-75.-P.163-189.
520. **Shope R. E., Peters C. J., Walker J. S.** Serological relation between Rift Valley fever virus and viruses of phlebotomus fever serogroup.//Lancet -1980.-1.-P.886-887.
521. **Schwentker F. F. Rivers T. M.** Rift Valley fever in man: Report of a fatal laboratory infection complicated by thrombophlebitis. //J Exp Med -1934.-59.-P. 305-313.

522. **Sleister H. M.**, Rao A.G. Strategies to generate antibodies capable of distinguishing between proteins with >90% amino acid identity. // J. Immunol. Meth.- 2001.- 252.- P.121-129.
523. **Sleister H. M.**, Rao A.G. Subtractive immunization: a tool for the generation of discriminatory antibodies to proteins of similar sequence. // J. Immunol. Meth.- 2002.- 261.-P. 213-220.
524. **Siam A. L., Meegan J. M.** Ocular disease resulting from infection with Rift Valley fever virus. Trans R Soc Trop Med Hyg -1980.-74.-P. 539-541.
525. **Siam A. L., Meegan J. M., and Gharbawi K. F.** Rift Valley fever ocular manifestations: observations during the 1977 epidemic in Egypt.//Br J Ophthalmol - 1980.-64.-P. 366-374.
526. **Sidwell, R. W., D. F. Smee** Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control.//Antiviral Res -2003.-57.-P. 101-111.
527. **Sindato C., Karimuribo E., Mboera E. G.** The epidemiology and socio-economic impact of Rift Valley fever epidemics in Tanzania: A review. //Onderstepoort J Vet Res - 2012.-79:E1.
528. **Sissoko D.** Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008./ **Sissoko D., Giry C., Gabrie P. et al.**//Emerg Infect Dis.- 2009.-15.-P.568-570.
529. **Smith D. R.** The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model./Smith D. R., Steele K. E., Shamblin J. et al.//Virology.- 2010.-407.-P.256-267.
530. **Smithburn K. C.** Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. //Br J ExpPathol.- 1949.-30.-P. 1-16.
531. **Smithburn K. C.**, Mahaffy A. F., Haddow A. J., Kitchen S. F., and Smith J. F. Rift Valley fever; accidental infections among laboratory workers.//J Immunol. -1949.-62.-P.213-227.
532. **Smithburn K. C., Haddow A. J., and Gillett J. D.** Rift Valley fever; isolation of the virus from wild mosquitoes.//Br J ExpPathol.- 1948.-29.-P.107-121.
533. **Soi R. K.** Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine./ Soi R. K., Rurangirwa F. R., McGuire T. C., et al. //Clin Vaccine Immunol -2010.-17.-P. 1842-1849.
534. **Sokolova T.M.** Alphavirus genomes recombination in mixed infection of tissue culture/T.M.Sokolova, O.V.Bobrova, T.K.Selivanova, A.Yu.Lebedev, L.V.Uryvaev, N.S.Bystrov, D.K.Lvov//Materials of Xth International Congress of Virology Jerusalem, Israel, 11-16 August.- 1996.- 131 p.
535. **Soldan S. S.**, Gonzalez-Scarano F. Emerging infectious diseases: the Bunyaviridae. //J Neurovirol.- 2005.-11.-P. 412-423.
536. **Solfrosi L.**, Mancini N., Canducci F. A phage display vector optimized for the generation of human antibody 4 combinatorial libraries and the molecular cloning of monoclonal antibody fragment//New 5 Microbiol.-2012.-35(3).-P.289-294

537. **Soliman A. et al.** Solid-phase immunosorbent technique for rapid detection of Rift Valley fever virus immunoglobulin M by hemagglutination inhibition./Soliman A. K., Botros B. A., and Morrill J. C.//J ClinMicrobiol -1988.-26.-P.1913-1915.
538. **Soti V.** Identifying landscape features associated with Rift Valley fever virus transmission, Ferlo region, Senegal, using very high spatial resolution satellite imagery./V Soti, V Chevalier, J Maura, A Bégué, C Lelong et al.//International journal of health geographics -2013.-12.-P. 10.
539. **Soti V** Combining hydrology and mosquito population models to identify the drivers of Rift Valley fever emergence in semi-arid regions of West Africa./V Soti, A Tran, P Degenne, V Chevalier, D Lo Seen, et al.//PLoS Negl Trop Dis -2012.-6:e1795.
540. **Soumaré PO**, Freire CC, Faye O, Diallo M, de Oliveira JV, Zanutto PM, Sall AA. Phylogeography of Rift Valley fever virus in Africa reveals multiple introductions in Senegal and Mauritania.//PLoS One.- 2012.-7(4):e35216
541. **Spalatin J.**, Turner AJ, Hanson RP. Observations on the transmissibility of lentogenic strains of Newcastle disease virus in water fowl: significance of variables. //Avian Dis. -1976.-20(2).-P. 361-368.
542. **Speis B.**, Hochrein H., Vabulas M. Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TRL9) but functions in TRL9-deficient mice//J. Immunol.-2003.-171.-P.5908-5912
543. **Spik K. et al.** Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus./K.Spik et al.//Vaccine -2006.-24.-P.4657-4666.
544. **Spickler A. R. and Roth J. A.** Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects.//J Vet Intern Med. -2003.-17.-P. 273-281.
545. **Stalknech DE**, Shape SM. Persistence of avian influenza virus in water//Avian Dis.-2008.-34(2).-P.406-411
546. **Steinhauer DA.** Influenza: pathways to human adaptation//Natura.-2013.-499(7459).-P.412-413
547. **Steward G.F.**, Culley A.I.,Wood-Charlson E.M. Grupp V: Negative-Sense RNA Virus. OrderMononegavirales in: Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition).-2013.-P.127-144.
548. **Struthers J. K.**, Swanepoel R., and Shepherd S. P. Protein synthesis in Rift Valley fever virus-infected cells. //Virology.- 1984.-134.-P.118-124.
549. **Suarez DL.** Avian influenza: our current understanding. Animal health reviews//Conference of reseach works in animal diseases.-2010.-11(1).-P.19-33
550. **Strauss JH.** Minus-strand RNA viruses in: Strauss JH, Strauss E. Viruses and human diseases, California, 2008.- P.137-193.
551. **Sun S, Wang Q, ZhaoF, Chen W, Li Z.** Glycosylation site alteration in the evolution of influenza H1N1 viruse. //PLoS ONE.-2011.-6.-P.22844-50.
552. **Sun X.**, Tse LV., Ferguson AD. Modification to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus.//J. Virol.-2010.-84(17).-P.8683-8690

553. **Suzich J. A.** and Collett M. S. Rift Valley fever virus M segment: cell free transcription and translation of virus-complementary RNA. //Virology -1988.-164.-P. 478-486.
554. **Suzich J. A.**, Kakach L. T., and Collett M. S. Expression strategy of a phlebovirus: biogenesis of proteins from the Rift Valley fever virus M segment. //J Virol. -1990.-64.-P.1549-1555.
555. **Svajger U.**, Anderluh M., Jeras M. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity.//Cell Signal. -2010.-22.-P.1397-1405.
556. **Swanepoel R. et al.** Comparative pathogenicity and antigenic cross-reactivity of Rift Valley fever and other African phleboviruses in sheep./Swanepoel R., Struthers J. K., Erasmus M. J., et al.//J Hyg (Lond) -1986.-97.-P.331-346.
557. **Swanepoel R.** and Blackburn N. K. Demonstration of nuclear immunofluorescence in Rift Valley fever infected cells. //J Gen Virol. -1977.-34.-P.557-561.
558. **Swanepoel R.**, Coetzer JAW, Tustin RC. *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town: Oxford University Press.- 2004. Rift Valley fever; pp. 2pp. 1037–1070
559. **Swayne DE.** D. Kapczynski Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in bird//Immunological reviews.-2008.-225.-P.314-331.
560. **Takahoshi T.** The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan/ T. Takahashi, K Maeda, T. Suzuki et al.//J. Infect. Dis.-2014.- 209.-P.816-827.
561. **Takehara K.** Identification of mutations in the M RNA of a candidate vaccine strain of Rift Valley fever virus./Takehara K., Min M. K., Battles J. K., Sugiyama K. et al.//Virology -1989.-169.-P.452-457.
562. **Takeuchi O.**, Akira S. Innate immunity to virus infection. //Immunol. Rev. -2009-227(1) .-P.75–86.
563. **Tan G. S.**, F. Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibody with Potent Broad-Spectrum Efficacy In Vivo/Tan G. S., F. Krammer, D. Eggink, A. et al.//Journal of Virology.- 2012.- V. 86.- N. 11.-P.6179–6188
564. **Tang D. C.**, DeVit M., Johnston S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. //Nature -1992.-356:152-154.
565. **Taubenberger, J. K** Hultin J. V, Morens D M Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context.//Antivir Ther. Author manuscript; available in PMC 2008 May 22. Antivir Ther. -2007; 12(4).-P.581–591.
566. **Terasaki, K.**; Murakami, S.; Lokugamage, K.G.; Makino, S. Mechanism of tripartite RNA genome packaging in Rift Valley fever virus.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA -2011.-108.-P.804–809.
567. **Tearina Chu T.H.**, Halverson R., Yadanbakhsh K., Oyen R., Reid M.E. A DNA-based immunization protocol to produce monoclonal antibodies to blood group antigens. // Br. J. Haematol.- 2001.- V.113.-P.32-36.
568. **Tesh R. B.**, Peters C. J., Meegan J. M. Studies on the antigenic relationship among phleboviruses. //Am J Trop Med Hyg -1982.-31.-P.149-155.

569. **Teichman B. F.**, Louw I., Engelbrecht A. Onderstepoort Rift Valley fever virus vaccines.-2010-P. 25-30. *In*: Proceedings of the 9th annual congress of the South African Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Med
570. **Tijssen P.** Kurstak E.: Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase antibody conjugates for enzyme immunoassays.//*Anal. Biochem.*-1984.-136.-P.451—457.
571. **Toapanta F. R.** and Ross T. M. Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: role of C3d in linking the innate and adaptive immunity. //*Immunol Res* -2006-36.-P.197-210.
572. **Tomori O.** Arbovirus infections among laboratory personnel in Ibadan, Nigeria./Tomori O., Monath T. P., O'Connor E. H. et al./ *Am J Trop Med Hyg* -1981.-30.-P.855-861.
573. **Traxler, G. S.** Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV/Traxler, G. S., E. Anderson, S. E. LaPatra, J. Richard, B. Shewmaker & G. Kurath. //*Dis Aquat Organ* -1999.-38.-P.183-190.
574. **Turell M. J.**, Saluzzo J. F., Tammariello R. F., and Smith J. F. Generation and transmission of Rift Valley fever viral reassortants by the mosquito *Culex pipiens*. *J Gen Virol* -1990.-71.-P.2307-2312.
575. **Turell, M. J.** Potential for North American mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus./Turell, M. J., D. J. Dohm, C. N. Mores et al.//*J Am Mosq Control Assoc.* -2008.-24.-P.502-507.
576. **Turell, M.J.** Vector competence of Egyptian mosquitoes for Rift Valley fever virus./Turell, M.J.; Presley, S.M.; Gad, A.M. et al//*Am. J. Trop. Med. Hyg.* -1996- 54.-P.136—139.
577. **Turell, M.J.; Kay, B.H.** Susceptibility of selected strains of Australian mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Rift Valley fever virus.//*J. Med. Entomol.* -1998, 35.-P.132—135.
578. **Ulmer J. B.**, Valley U., Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. //*Nat Biotechnol.* -2006-24.-P.1377-1383.
579. **Uryvaev L.V.** Primary structure of WEE virus genome RNA/L.V.Uryvaev, A.Yu. Lebedev, T.M.Sokolova, V.P. Yupherov//*Materials of 3-rd Congress of the European Society for Veterinary Virology. Interlaken, Switzerland, Spt* -1994.-P. 8-20.
580. **Van der Lungt J. J.**, Coetzer J. A., Smitt M. M. Distribution of viral antigen in tissues of new-born lambs infected with Rift Valley fever virus.//Onderstepoort //*J Vet Res* -1996.-63.-P.341-347.
581. **Van der Wal FJ**, Achterberg RP, de Boer SM, Boshra H, Brun A, Maassen CB. et al. Bead-based suspension array for simultaneous detection of antibodies against the Rift Valley fever virus nucleocapsid and Gn glycoprotein.//*J Virol Methods.*- 2012.-183.-P.99—105.
582. **van Velden D. J.**, Meyer J. D., Olivier J. Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinicopathological study. //*S Afr Med J.*- 1977.-51.-P.867-871.

583. **Vialat P.**, Billecocq A., Kohl A., Bouloy M. The S segment of Rift Valley fever phlebovirus (Bunyaviridae) carries determinants for attenuation and virulence in mice. //J Virol.- 2000.-74.-P.1538-1543.
584. **Vialat P.**, Muller R., Bouloy M. Mapping of the mutations present in the genome of the Rift Valley fever virus attenuated MP12 strain and their putative role in attenuation. //Virus Res -1997.-52.-P.43-50.
585. **Villasenor D.**,U.Hirosh Ito, T. Suzuki Molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from vaccinated commercial poultry farm in nonepidemic area of Jahan.//Virology Journal .-2013.- 10.-P.330
586. **von Teichman B.** Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves./von Teichman B., Engelbrecht A., Zulu G., Dungu B., Pardini A., and Bouloy M //Vaccine - 2011.-29.-P.5771-5777.
587. **Van Oirschot, J. T.** Diva vaccines that reduce virus transmission.//J Biotechnol - 1999.-73.-P.195-205.
588. **Yadani F. Z.**, The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein./ Yadani F. Z., Kohl A., Prehaud C., Billecocq A., and Bouloy M. //J Virol.- 1999.-73.-P.5018-5025.
589. **Yin HS.** Structure of the uncleaved ectodomain of the *Paramyxovirus* (hPIV3) fusion protein// Proc Natl Acad Sci.-2005.-105.-P.9288-9293
590. **Yi N,Ke Ma, Jing Ni et al.** A rapid and single approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA immunization.//Cell Mol Immunol.-2004.-1(14).-P. 295-299.
591. **Y. Zhang** Expression and purification of the nucleocapsid protein of Schmallenberg virus, and preparation and characterization of a monoclonal antibody against this protein./Yongning Zhang et al.//Protein Expression and Purification. 08/2013; DOI: 10.1016/j.pep.2013.08.012
- 592.**Youssef, B. Z. & H. A. Donia** The potential role of rattus rattus in enzootic cycle of Rift Valley Fever in Egypt 2-application of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in blood samples of Rattusrattus. //J Egypt Public Health Assoc - 2002.-77.-P. 133-141.
593. **Yu XJ**, Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China/XJ. Yu, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL//The New England Journal of Medicine. -2011. PMID: 21410387.
594. **Yusibov V.**, Streatfield S. J., and Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. //Hum Vaccin - 2011.-7.-P.313-321.
595. **Wallace D. B.** Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever./D. B.Wallace, Ellis C. E., Espach A., Smith S. J., Greyling R. R., and Viljoen G. J. //Vaccine. -2006.-24.-P.7181-7189.

596. **Warimwe GM**, Lorenzo G, Lopez-Gil E, Reynes-Sandoval A, Cottingham MG, Spencer AJ, et al. Immunogenicity and efficacy of a chimpanzee adenovirus-vectored Rift Valley fever vaccine in mice.//*Virol J.*- 2013.-10.-P. 349-355.
597. **Wang S.**, Parker J., Solorzano A., Garsia-Sastre A., Lu S. Heterologous HA DNA vaccine prime-inactivated influenza vaccineboost is more effective than using DNA or inactivated vaccine alone in eliciting antibody responses against H1 or H3 serotype influenza viruses/Wang S., Parker J., Solorzano A., Garsia-Sastre A., Lu S. //*Vaccine*-2008.- 26.-P. 3626–3633.
598. **Wanga Jing-Yu**, Juan-Juan Rena, Wan-Hua Liua, et al. Complete genome sequence of a new H9N2 avian influenza virus isolated in China.//*Genome Announc.* - 2013-1(3):e00261-13. doi:10.1128/genomeA.00261-13.
599. **Wasmoen T. L.**, Kakach L. T., Collett M. S. Rift Valley fever virus M segment: cellular localization of M segment-encoded proteins. //*Virology* -1988.-166.-P.275-280.
600. **Weber F.** and Elliott R. M. Antigenic drift, antigenic shift and interferon antagonists: how bunyaviruses counteract the immune system. //*Virus Res* -2002.-88.-P.129-136.
601. **Weingartl, H.M.** Efficacy of a recombinant Rift Valley fever virus MP-12 with NSm deletion as a vaccine candidate in sheep./H.M. Weingartl; Nfon, C.K.; Zhang, S.; Marszal, P.; Wilson, W.C.; Morrill, J.C.Development of Rift Valley fever virus viremia challenge model in sheep and goats//*Vaccine*- 2014.- 32.-P. 2345–2349.
602. **Wei Sheng**, Wu Xue Bao Study on DNA immune of envelope protein gene of Rift valley fever virus. -2007.-47(4) .-P.677-81
603. **Wiwanitkit V.** Emerging Rift valley fever in China//*Asian Pacif J. Trop. Biomed.*- 2016.-6(9).- P.727-729.
604. **White J.** Structure and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme/ White J. et al.//*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*-2008.- 043.-P. 189-219.
605. **Wilson WC**, Diagnostic approaches for Rift Valley fever./WC. Wilson, Weingartl HM, Drolet BS, Davé K, Harpster MH.et al.//*Dev Biol (Basel)*. -2013.-135.-P. 73-8.
606. **Wingren C.**, Borrebaeck CA. Antibody-based microarrays.//*Methods Mol Biol.* - 2009.-509.-P.-57-84.
607. **Wolff J. A.** Direct gene transfer into mouse muscle in vivo./ Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W. et al.//*Science*- 1990.-247.-P.1465-1468.
608. **Wolff J. A.** Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression.//*Adv Genet.*-2005.-54.-P.3-20.
609. **Won S.**, Ikegami T., Peters C. J., and Makino S. NSm and 78-kilodalton proteins of Rift Valley fever virus are nonessential for viral replication in cell culture. //*J Virol* - 2006.-80.-P.8274-8278.
610. **Wong FYK.** Reassortant highly pathogenic influenza A (H5N6) virus in Laos/Wong FYK et al.//*Emerg.Infect Dis.* -2015.-v.23(3).-P. 241-249.
611. **Woodland, D. L.**, Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. //*Trends Immunol.*- 2004.-25.-P.98-104.

612. **Woods C. W.**, Karpati A. M., Grein T. An outbreak of Rift Valley fever in Northeastern Kenya, 1997-98./Woods C. W., Karpati A. M., Grein T. et al.//Emerg Infect Dis -2002.-8.-P.138-144.
613. **World Helath Organisation** “International health regulation enter into force”//Режим доступа last cite on 2012 Jan 15/Available from: <http://www.whoedia.org/en/section1> 1417.asp.
614. **World Organisation for Animal Helath (OIE).** (2008). Rift Valley fever, p. 323-333. In: OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals manual.//Режим доступа: <http://www.oie.int/>.
615. **WHO**, Outbreaks of Rift Valley Fever in Kenya, Somalia and United Republic of Tanzania, December 2006-April 2007. In.: World Health Organization, pp.
616. **World Organisation for Animal Helath (OIE).** Rift Valley fever, South Africa – update. Weekly Epidemiological Record -2010.- 21.-P.185-186
617. **World Organization for Animal Health (OIE).**Manual of diagnostic tests and vaccines 2014 [online]. Paris: OIE; 2014. Rift Valley fever. Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.14_RVF.pdf . Accessed 3 Jan 2015
618. **World Organisation for Animal Health (OIE).** Rift Valley fever. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2015. Chapter 2.1.14. Режим доступа:<http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> .
619. **Wu W**, Zhang S, Qu J, Zhang Q, Li C, Li J, et al. Simultaneous detection of IgG antibodies associated with viral hemorrhagic fever by a multiplexed Luminex-based immunoassay.//Virus Res.- 2014.-187.-P. 84–90.
620. **Wu Y. and Kipps T. J.** Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes. //J Immunol.- 1997-159.-P.6037-6043.
621. **Zanetti M** B limfocytes as antigen-presenting cell-based genetic vaccines/ M Zanetti, P. Castiglioni, M Rizzi, M Gerloni//Immunol. Rev.-2004.-199.-P. 264-278
622. **Zasedateleva O. A.** Gel-based oligonucleotide microarray approach to analyze protein–ssDNA binding specificity/ O. A.Zasedateleva, A. L. Mikheikin, A. Y. Turygin et al//Nucleic Acids Res.- 2008.- 36(10): e61
623. **Zeller H., and Bouloy M.** Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae.//Rev Sci Tech.- 2000.-19.-P.79-91.
624. **Zhao G.**; Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China./G.Zhao; Gu, X.; Lu, X.; Pan, J.; Duan, Z.; Zhao, K.; Gu, M.; Liu, Q.; He, L.; Chen, J.; et al.//PLOS ONE.- 2012.-7, e46183.
625. **Zhang J.** The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging/Zhang J. et al.//Virology.-2000.-v.269(2).-P.325-334

626. **Zheng S.** Genomic and evolutionary characterization of a novel influenza C-like virus from swine./Zheng S, Ran Z, Wang D, Hoppe A, et al.//Archives of Virology - 2014.-159.-P.249-255.
627. **Zhirnov OP.**, Ikizler MR., Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases.//J.Virol.-2002.-76.-P.8682-8689
628. **Zhu P.** Mechanism and regulatory function of CpG signaling via scavenger receptor B1 in primary B cells./ **Zhu P., Liu X., Treml L.S., Canoro M.P., Freedman B.D.** //J.Biol Chem.-2009.-284.-P.22878-22887.
629. **Zimmermann U.**, Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena.//Biochemica et Biophysica Acta, -1982.- 694.- P. 227-277
630. **Zhou X,** Wang D, Xiong J, Zhang P, Li Y, She R. Protection of chickens, with or without maternal antibodies, against IBDV infection by a recombinant IBDV-VP2 protein.//Vaccine, 2010.-28.-P. 3990–6.

9. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

1940

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

УДК619:578.832.1:577.2

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ВЫЯВЛЕНИЮ НЕЙРАМИНИДАЗЫ N1 ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Покров 2006 г.

Методические указания по выявлению нейраминидазы N1 вируса гриппа птиц методом полимеразной цепной реакции разработаны в лаборатории "Биофизика" ГНУ ВНИИВВиМ.

РАЗРАБОТЧИКИ:

кандидат биологических наук
аспирант
кандидат биологических наук
кандидат ветеринарных наук
кандидат ветеринарных наук
кандидат ветеринарных наук
доктор биологических наук, профессор

Жигалева О.Н.
Бурдинский В.Г.
Власова Н.Н.
Орлов А.А.
Калушнова О.В.
Колбасов Д.В.
Цыбанов С.Ж.

Рецензенты: к.в.м. Виткова О.Н. (МДЦ РФ)
к.в.м. Луницин А.В. (ВНИИВВиМ)

Материалы одобрены на заседании секции «Инфекционная патология животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН протокол № 3 от 28 сентября 2006г

БИБЛИОТЕКА
Всероссийского НИИ
ветеринарной патологии
и микробиологии

Приложение 2.



Методически указания по выявлению гематоглотинина H5 вируса гриппа птиц: методы полимеразной цепной реакции разработаны в лаборатории "Тифоник" ГНУ ВНИИЗВВиМ

РАЗРАБОТЧИКИ:

кандидат биологических наук	Жигалова О.Н.
аспирант	Бурлаковский В.Г.
кандидат биологических наук	Павлова И.И.
кандидат ветеринарных наук	Орлов А.А.
кандидат ветеринарных наук	Капустина О.В.
кандидат ветеринарных наук	Корбасов Д.В.
доктор биологических наук, профессор	Цыбизов С.Ж.

Рецензенты: к.в.н. Виткова О.Н. (МДЦ РФ)
к.в.н. Румянцев А.В. (ВНИИЗВВиМ)

Материалы одобрены на заседании секции «Инфекционные патологии животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН протокол № 3 от 28 сентября 2006г.



Приложение 3.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ		(19) RU ⁽¹¹⁾ 2 457 255 ⁽¹³⁾ C2
		(51) МПК C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/33 (2006.01)
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ		
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ		
(21)(22) Заявка: 2010122054/10, 01.06.2010 (24) Дата начала отсчета срока действия патента: 01.06.2010 Приоритет(ы): (23) Дата подачи заявки: 01.06.2010 (43) Дата публикации заявки: 10.12.2011 Бюл. № 34 (45) Опубликовано: 27.07.2012 Бюл. № 21 (56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SALL A.A. et al., "Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera", J Virol Methods. 2001 Jan; 91(1):85-92. RU 2122210 C1, 20.11.1998. RU 2112245 C1, 27.05.1998. Адрес для переписки: 601120, Владимирская обл., г. Покров, ГНУ ВНИИВВ и М	(72) Автор(ы): Власова Наталья Никифоровна (RU), Закутский Николай Иванович (RU), Цыбанов Содиом Жамьянович (RU), Хухорова Ирина Юрьевна (RU), Капустина Ольга Владимировна (RU) (73) Патентообладатель(и): Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии (RU)	
(54) СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПРАЙМЕРЫ, СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА (57) Реферат: Изобретение относится к области биотехнологии. Способ заключается в том, что подобраны праймеры и оптимизированы условия постановки ПЦР на основе амплификации фрагментов последовательностей гена NS₅ для выявления вируса и установления предварительного диагноза на ЛДР. С помощью ПЦР-технологии и рестрикционного анализа можно выявлять РНК в пробах органов, в том числе разложившихся тканях павших животных, в вирусосодержащих культуральных материалах, объектах ветеринарного надзора, и проводить дифференциацию штаммов и изолятов вируса ЛДР. Данный способ предназначен для включения в программу профилактики и эпизоотологического мониторинга болезни и может быть использован в любой диагностической лаборатории без ущерба для здоровья работающего с возбудителем персонала. 2 ил. ф-лы, 2 табл., 1 пр.		

Приложение 4.

Российская академия
Сельскохозяйственных наук
ГНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ
601120, г. Покров, Владимирской обл.
На № _____ от



Колбасов Д.В.
2008г.

« _____ » _____ 2008г.

АКТ

межлабораторных комиссионных испытаний
выявления и дифференциации
гемагглютининов вируса гриппа птиц 5 и 7
сероподтипов в экстраэмбриональной
жидкости куриных эмбрионов и пробах
органов птиц инфицированных вирусом
гриппа А, прямым «сэндвич» - вариантом ТФ
ИФА на основе специфических
моноклональных антител.

Согласно указанию директора ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии
№20 от 14 августа 2008г в соответствии с утвержденной программой
испытаний, в период с 15 по 20 августа 2008 года проведены комиссионные
испытания прямого «сэндвич» - варианта ТФ ИФА на основе
моноклональных антител для выявления антигенных детерминант
гемагглютинина и дифференциации антигенов вируса гриппа птиц 5 и 7
сероподтипа.

Состав комиссии:

Балашова Е.А. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории
«Диагностика» (председатель);

Кушнир А.Т. – д.в.н., заведующий лабораторией «Индикация
микроорганизмов»;

Капустина О.В.- к.в.н., ведущий научный сотрудник лаборатории
«Иммунология»;

Жиангерова О.В.- младший научный сотрудник лаборатории
«Иммунология»;

Испытания диагностического метода проведены на базе лаборатории
«Иммунология» ГНУ ВНИИВВиМ в соответствии с программой
комиссионных испытаний, утвержденной директором ГНУ ВНИИВВиМ
Колбасовым Д.В.

Протоколы испытаний прилагаются.

Приложение 5.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
Государственное научное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

УТВЕРЖДАЮ

академик-секретарь Отделения
ветеринарной медицины

Россельхозакадемии

Академик Россельхозакадемии

А.М. Смирнов



«24» 12 2009 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ
5 И 7 ПОДТИПОВ «СЭНДВИЧ» - МЕТОДОМ ТФ ИФА НА ОСНОВЕ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ.

ПОКРОВ 2009 г.

Методические рекомендации разработаны в лаборатории Биофизики ГНУ всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии (ВНИИВВиМ).

Разработчики: заведующий лабораторией Иммунологии ВНИИВВиМ, доктор биологических наук Б.В. Новиков, ведущий научный сотрудник ВНИИВВиМ, к.б.н. О.В. Капустина, м.н.с. О.В. Жиангерова

Научно-методические рекомендации разработаны для специалистов, работающих в области агропромышленного комплекса по ветеринарной медицине

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены на секции «Ветеринарная биотехнология» Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 3 от 29 октября 2009 г.)

Рецензент: доктор биологических наук, профессор С.Ж. Цыбанов (ВНИИВВиМ)

Ответственная за выпуск: заведующая сектором Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии кандидат биологических наук Л.В. Бабыцова

Приложение 6.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

УТВЕРЖДАЮ

Директор ГНУ ВНИИВВиМ

Россельхозакадемии

Колбасов Д.В.



"09" 06 2011 г.

АКТ

09.06.11 № 5

комиссионных испытаний «Набора препаратов для выявления РНК вирусов болезни Найроби и лихорадки долины Рифт методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени»

Акт составлен комиссией в составе:

председатель:

- зав. лаб. Экспериментальной микробиологии, д.б.н. Селянинов Ю.О.;

члены комиссии:

- зав. Научно – экспериментальным отделом, к.в.н. Живодеров С.П.,

- в.н.с. лаб. Иммунологии, к.в.н. Капустина О.В.;

- и. с. лаб. Биохимии, к.б.н. Южук Т.Э.;

- аспирант лаб. Биофизики Сальников Н.И.

ЦЕЛЬ ИСПЫТАНИЙ

Комиссия в период с 20 апреля по 25 мая 2011 г. провела комиссионные испытания «Набора препаратов для выявления РНК вирусов болезни Найроби и лихорадки долины Рифт методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» в соответствии

Приложение 7.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
Государственное научное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

УТВЕРЖДАЮ
академик – секретарь Отделения
Ветеринарной медицины
Россельхозакадемии,
академик Россельхозакадемии



А.М. Смирнов
А.М. Смирнов
2011 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ
ПО ВЫЯВЛЕНИЮ РНК ВИРУСОВ БОЛЕЗНИ НАЙРОБИ И
ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ.

Покров 2011

Методические положения разработаны в лаборатории Биофизики ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВВиМ).

Разработчики: директор ГНУ ВНИИВВиМ, д.в.н., профессор Д.В. Колбасов, заведующий лабораторией Биофизики ГНУ ВНИИВВиМ, профессор Цыбанов С.Ж., к.в.н., ведущий научный сотрудник О.В. Капустина, аспирант Н.И.Сальников.

Методические положения предназначены для работников исследовательских и диагностических учреждений ветеринарного профиля.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены на секции «Инфекционная патология животных» Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии

(Протокол № 4 от 23 сентября 2011 г.)

Рецензенты: доктор биологических наук, профессор В.И. Еремец (ВНИИТИБП) и доктор биологических наук, профессор Ю.О. Селянинов (ГНУ ВНИИВВиМ).

Ответственный за выпуск: главный специалист сектора Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии кандидат ветеринарных наук А.В.Суворов.



Приложение 8.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

УТВЕРЖДАЮ

академик – секретарь Отделения
ветеринарной медицины
Россельхозакадемии,
академик Россельхозакадемии
А.М. Смирнов



«10» _____ 2011 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

ПО ПОЛУЧЕНИЮ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ
К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ р30
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ (АЧС)

Покров 2011г

Методические положения разработаны в лаборатории Биохимии ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Разработчики:

д.б.н. Власова Н.Н. аспирант Казакова А.С.; аспирант Першин А.С.; к.в.н. Капустина О.В.; к.в.н. Южук Т.Э.

Методические положения рассмотрены и одобрены на заседании секции «Инфекционной патологии животных» отделения ветеринарной медицины РАСХН Протокол № 4 от 23 сентября 2011 г.

Рецензенты:

Зав. лабораторией Диагностики ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, доктор ветеринарных наук, профессор **В.В. Куринов;**

Зам директора по НИР ВНИТИБП, доктор биологических наук, профессор **В.И. Еремен**

Методические положения предназначены для сотрудников ветеринарных лабораторий и для проведения научно исследовательских работ.

Ответственный за выпуск: главный специалист Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии, кандидат ветеринарных наук А.В. Суворов

Приложение 9.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕЩЕНИЕ

№ 2409384

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОКАПСУЛ ДЛЯ ДОСТАВКИ
ДНК В МАКРООРГАНИЗМ**

Патентообладатель(и): *Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № **2009126856**
 Приоритет изобретения **15 июля 2009 г.**
 Зарегистрировано в Государственном реестре
 изобретений Российской Федерации **20 января 2011 г.**
 Срок действия патента исчисляет **15 июля 2029 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной
 собственности, патентам и товарным знакам

 **И. Н. Симонов**



Автор(ы): *Балышева Вера Ивановна (RU), Марквичева Елена
Ариольдовна (RU), Власова Наталья Никифоровна (RU),
Белов Сергей Юрьевич (RU), Капустина Ольга Владимировна
(RU), Селина Оксана Евгеньевна (RU)*

Приложение 10.

Российская академия
сельскохозяйственных наук
ГЛАВНОУСЕРОССТЫЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ
601120, г. Покров, Владимирской обл.
На № _____ от _____ 2013г.

УТВЕРЖДАЮ
ГЛАВНОУСЕРОССТЫЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ
Колосов Д.В.
03 2013г.

АКТ
проведения межлабораторных комиссионных
испытаний по определению активности и
специфичности антигенных детерминант к
антигенам детерминантам структурного
белка р30 вируса АЧС и их подтипной
специфичности

Комиссия в составе:
Стрижков С.М. – к.в.н., ведущий научный сотрудник лаборатории
Диагностики – председатель;
Житлов С.П. – к.в.н., зав. НЭО;
Павлов В.М. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории
Диагностики;
Тихов Н.Х. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории Биохимии;
Коростов О.В. – к.в.н., ведущий научный сотрудник лаборатории
Биотехнологии;
Дерягин А.С. – младший научный сотрудник лаборатории
Биотехнологии.

На основании указания директора от 1 ноября 2012г. в соответствии с
утвержденной программой испытаний, в период с 1 декабря по 31 декабря
2012г. проведены комиссионные испытания по определению активности и
специфичности антигенных детерминант к антигенам детерминантам
структурного белка р30 вируса АЧС и их подтипной специфичности.

Приложение 11.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ



МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

ПО ПОЛУЧЕНИЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
К СТРУКТУРНОМУ БЕЛКУ р30
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДА «ПРАЙМ-БУСТЕРНОЙ» ИММУНИЗАЦИИ
РЕКОМБИНАНТНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ

Покров 2013 г.

Приложение 12.



Бланк № 33 от 22.11.2014

Автор(ы): *Першин Андрей Сергеевич (RU), Казакова Анна Сергеевна (RU), Капустина Ольга Владимировна (RU), Власова Наталья Никифоровна (RU)*

ПО ИЕ

(12)

(21)

(24)

Пр

(22)

(45)

(56)

Адр

(54)

АФ

стр

мы

им

бел

рек

(56)

Afe

Vir

Приложение 13.



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя

Россельхознадзора

Е.А. Непоклонов

"31" октября 2006 г.

Инструкция
по применению «Набора препаратов на основе
моноклональных антител для дифференциальной
диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла»

(организация-производитель – ГНУ ВНИИВВиМ
Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл.)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор препаратов на основе моноклональных антител для дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни Ньюкасла.

2. Набор предназначен для выявления и дифференциальной диагностики иммуноферментным методом антигенов (нуклеопротеинов) вируса гриппа птиц (ВГП) и вируса ньюкаслской болезни (ВБН) в пробах органов от больной и павшей птицы, а также в экстраэмбриональной жидкости зараженных куриных эмбрионов, лизатах зараженной культуры клеток - при выделении вируса на этих моделях.

3. В состав Набора входят:

Иммуноспецифические компоненты:

- отрицательный контроль – антиген из экстраэмбриональной жидкости интактных куриных эмбрионов, (К⁻), 0,5 см³ - 1 ампула.
- положительный контроль- антиген из экстраэмбриональной жидкости куриных эмбрионов, инфицированных вирусом гриппа птиц (К⁺ВГП), 0,5 см³ - 1 ампула.
- положительный контроль - антиген из экстраэмбриональной жидкости куриных эмбрионов, инфицированных вирусом ньюкаслской болезни (К⁺ВБН), 0,5 см³ - 1 ампула.
- пероксидазный конъюгат моноклональных антител к нуклеопротеину ВГП (ПК-ВГП), 10-кратный концентрат, 0,5 см³ - 2 ампулы.

Приложение 14.

СТО ВНИИВВиМ 00495549-0011-2006

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Руководителя Федеральной
службы по ветеринарному и
фитосанитарному надзору

 Е.А. Непоклонов
2006 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ГНУ ВНИИВВиМ
Д.В. Колбасов
« 15 » ноября 2006г.

**СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ
ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
НАБОР ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ГРИППА ПТИЦ И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА**

СТО 00495549-0011-2006

СОГЛАСОВАНО:

Директор ФГУ «Всероссийский
государственный Центр качества и
стандартизации лекарственных средств для
животных и кормов», председатель ТК 454

 А.Н. Панин
« » _____ 2006 г.

I

Приложение 15.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
 ГУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
 ИНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
 (ВНИИВВиМ)

УТВЕРЖДАЮ



директор ГУ ВНИИВВиМ

В.М. Котляров

10-11-2002 2002 г.

Отчет

об экспериментальном изучении

**"Набора на основе моноклональных антител для
 дифференциальной диагностики гриппа птиц и болезни
 Ньюкасла твердофазным иммуноферментным методом"**

Зам. директора по НИР,
 кандидат биологических наук

В.И. Жестерев

Научные руководители работы:
 старший научный сотрудник
 кандидат ветеринарных наук

И.М. Сургучева

Покров - 2002 г.

Приложение 16.

Утверждаю

Директор ФГТУ «Всероссийский
государственный Центр качества и
стандартизации лекарственных средств для
животных и кормов», председатель ТК 454



А.Н. Пашин

14 06 2002г.

АКТ

**Межведомственных комиссионных испытаний образцов
«Набора препаратов на основе моноклональных антител для
дифференциальной диагностики гриппаптии и болезни Ньюкасла
твердофазным иммуноферментным методом»**

Согласно приказа заместителя руководителя департамента Селиверстова В.В. № 16 от 11 июня 2002 г. и в соответствии с утвержденной программой испытаний, 17 июня на базе лаборатории «Препаратов, применяемых в птицеводстве» ВГНКИ, проведены межведомственные комиссионные испытания опытно-промышленных образцов «Набора препаратов на основе моноклональных антител для дифференциальной диагностики гриппаптии и болезни Ньюкасла твердофазным иммуноферментным методом» комиссией в составе: председателя — заведующего лабораторией ВГНКИ Смоленского В.И., членов комиссии — заведующего отделом «Иммуноферментного анализа» Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории Витковой О.Н., старшего научного сотрудника ВГНКИ Руденко Т.Н., заведующего лабораторией ВНИИВВиМ Ласуткина Н.А., старшего научного сотрудника ВНИИВВиМ Капустинской О.В., старшего научного сотрудника ВНИИВВиМ Сургулевой И.М., заведующего Отдела биологического контроля Луницина А.В.

На испытание были представлены 3 образца указанного набора, изготовленные в период с мая по июль 2002г. в ГУ ВНИИВВиМ.

Приложение 17.

Приложение

ПАСПОРТ

штамма гибридных клеток
 шифр клон гибридомы ВЛДPSp2/0-5C12.13.
 продуцирующих моноклональные антитела к гликопротеину Gp вируса лихорадки
 долины Рифт

1. Наименование организации, где был получен штамм	Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии
2. Авторский коллектив, дата получения штамма	Капустина О.В., Юрков С.Г., ноябрь 2013 года
3. Почтовый адрес заявителя	601125 Владимирская область, Петушинский р-н, п. Вильгинский, ул. Академика Бакулова, стр.1
4. Причины депонирования (продуцент, штамм, перспективный для биотехнологии; тест-культура; модель для лабораторных исследований)	Штамм- продуцент моноклональных антител
Характеристика штамма гибридных клеток:	
1. Родословная штамма (родительские клетки гибридомы, антиген, сливающий агент, система селекции гибридных клеток, кратность клонирования)	Гибридный штамм ВЛДPSp2/0-5C12.13 получен слиянием мышиных миеломных клеток Sp2/0, Ag14-1 со спленоцитами мыши линии BALB/c, иммунизированной рекомбинантной ДНК, кодирующей гликопротеин Gp и рек Gp вируса ЛДР Сливающий агент ПЭГ-4000 в 40% концентрации. Система селекции HAT Кратность клонирования - 3
2. Число пассажей к моменту паспортизации и депонирования	Проведено 10 пассажей в культуре и 2 на сниженных мышах
3. Стандартные условия выращивания (состав питательной среды, температура, и т.д.)	Среда культивирования - ДМЕМ (модифицированная Дульбекко среда Игла) с добавлением 10% фетальной сыворотки крови, 2мМ глютамина, 1мМ пирувата натрия, 50 мкг/мл гентамицина. Температура культивирования 37 °С, 95% влажности в атмосфере 5% CO ₂
4. Культуральные свойства (способ культивирования, посевная концентрация, кратность посева, время субкультивирования и другие ростовые характеристики и особенности штамма)	Тип роста — стационарная суспензия, метод пересева — встряхивание, частота пассирования — через 2-3 суток, посевная концентрация 150 тыс. кл. в см ³ , кратность посева 1:2-1:3
5. Характеристика культивирования гибридомы в организме животного (вид животного, доза клеток при пересеве, метод сенсibilизации животного, время образования асцита, перевиваемость)	Штамм можно культивировать в брюшной полости мышей линии BALB/c, сенсibilизированных за 7-10 дней интраперитонеальной инъекцией 0,5см ³ пристана. Доза клеток 1-2 млн кл/мышь. Время образования асцита 10-14 суток. Объем -3-10 см ³ . Рост в виде асцитной или солидной опухоли. Перевиваемость до 10 пассажей (срок наблюдения)
6. Кариологическая характеристика штамма (распределение клеток по числу	Карิโอтип соответствует мышиному. Модальный класс 96 хромосом

хромосом с указанием маркерных хромосом)	(20% клеток), модалый класс для родительской мисдомной линии – 72 хромосомы. В кариотипе клеток штамма идентифицированы 12 и 6 хромосомы, несущие структурные гены иммуноглобулинов
7. Контроль контаминации бактериями, грибами, микоплазмами	Клетки не контаминированы
8. Характеристика полезного вещества, продуцируемого штаммом (для иммуноглобулинов – указание класса, специфичности и методов ее оценки)	Штамм продуцирует МКА класса IgG2a к конформационной консервативной детерминанте гликопротеина Gp вируса лихорадки долины Рифт, что подтверждено методами иммунофлуоресценции, ИФА, иммуноблоттинга. Моноклональные антитела взаимодействуют с антигеном вируса ЛДР. Стабильность продукции МКА сохраняется на протяжении 15 пассажей в культуре и 10 пассажей на мышцах линии BALB/c
9. Способ криоконсервирования (среда, криопротектор, режим замораживания и оттаивания, условия длительного хранения, жизнеспособность клеток после криоконсервирования с указанием метода ее оценки)	Клетки консервируют в жидком азоте в криобирках в объеме 2,0 см ³ с концентрацией 5-10 млн.кл/см ³ . Гибридные клетки сохраняют свою жизнеспособность при температуре хранения минус 70 °С в течение 6 месяцев. Криозащитная среда: среда DMEM с 30% ФСТ и 10% диметилсульфоксида. После ресуспендирования клеток в криозащитной среде и расфасовки, ампулы выдерживают 1 час при 4 °С, затем 2-3 суток - при минус 70 °С, после чего быстро переносят в сосуд с жидким азотом. Клетки восстанавливают из заморозки, помещая ампулы в водяную баню с температурой плюс 40 °С. Выживаемость клеток после хранения 80-85%. Жизнеспособность штамма определяется морфологическими признаками и сохранением способности продуцировать МКА.
10. Другие особенности штамма	Культура состоит из полиморфных клеток, содержащих крупные ядра, оттесненные к периферии цитоплазмы. Штамм онкогенен для синтетических мышечных

Заведующий коллекцией
штаммов культур клеток,
главный научный сотрудник
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии



С.Г. Юрков