

**Капустина Ольга Владимировна**

**«Разработка и совершенствование средств и методов контроля особо опасных инфекций, вызванных вирусами порядка *Mononegavirales*»**

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

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора ветеринарных наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Государственном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии»

Научный консультант

Доктор биологических наук, профессор Власов Николай Анатольевич

Официальные оппоненты:

Диев Вячеслав Иванович - доктор ветеринарных наук, профессор, Федеральный центр охраны здоровья животных, главный научный сотрудник

Бурцева Елена Ивановна - доктор медицинских наук, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, руководитель лаборатории

Ярыгина Елена Игоревна - доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, профессор кафедры

Ведущая организация: ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016г. в «\_\_\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (ФГБНУ ВИЭВ), 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24/1  
Тел/факс: (495) 970-03-69

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ВИЭВ, [viev.ru](http://viev.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

доктор биологических наук



Ездакова Ирина Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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, (Львов Д.К. и др., 2008; Бобылов Ю.А. и др., 2012; Ларичев В.Ф. и др., 2012; Alder A. et al., 2014 и др.). 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 (Barr I.G. et al., 2010; Cito F. et al., 2013 и др.), вызванных возбудителями, относящимися к порядку *Mononegavirales* (Bridgen, A. et al., 1996; Strauss J.H. et al., 2008; ICTV, 2013 и др.), геном которых представлен отрицательной одноцепочечной РНК. Большинство из них, в том числе лихорадка долины Рифт, высокопатогенный грипп птиц и болезнь Ньюкасла входят в список трансграничных особо опасных болезней (Ларичев В.Ф. и др., 2012; Métras R. et al., 2011 и др.), потенциальных агентов биологического оружия (Сандахчиев М.С. и др., 2004; Бобылов Ю.А. и др., 2012; Chomel D.D. et al., 2011 и др.). Именно эти инфекционные болезни рассматриваются в данной работе в связи со сложившейся эпизоотической обстановкой по гриппу птиц (Аканина Д.С. и др., 2014; Джавадов Э.Д. и др., 2006; Найхин А.И. и др., 2012; Barr I.C. et al., 2010; Wong F.Y.K. Et al., 2015), болезни Ньюкасла (Усачев Е.В. и др., 2005; Журавлева В.А., 2009; Донченко А.С. и др., 2013; и др.) и ЛДР (Ганнушкина Л.А. и др., 2012; Попов И.О. и др., 2013; El Mamy A. V. et al., 2011; Maquart M. et al., 2014; Wiwanitkit V. et al., 2016 и др.). Угроза тяжелых последствий появления и распространения трансграничных болезней особо остро стоит ввиду отсутствия эффективных лицензированных средств их оперативной диагностики, специфической профилактики и лечения (Черкасский Б.Л. и др., 2007; Шестопалов А.М. и др., 2013; и др.).

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 (Хрипунов Е.М., 2000; Онищенко Г.Г. и др., 2005; Львов Д.К. и др., 2010; Шестопапов А.М. и др., 2013 и др.).

Возникающие и вновь возвращающиеся возбудители инфекционных болезней создают ряд проблем их диагностики, обусловленных постоянно происходящим изменением природы возбудителя (Аканина Д.С. и др., 2014; Джавадов Э.Д. и др., 2006; Усачев Е.В., 2005; Zhao G. et al., 2012; Zheng S. et al., 2014). 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 (Абелев Г.И., 1998; Разумов И.А. и др., 2008; Казачинская Е.И., 2010; Basselaar T. et al., 1991; Jakell R. et al., 2013 и др.). 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 (Чубухова О.В. и др., 2008; Мухаметханов Е.Э. и др., 2010; Ризванов А.А., 2010; Романович А.Э. и др., 2001; Самойлович Н.И., 2006 и др.), которые позволяют создавать уникальные препараты стандартизированных МКА и рекомбинантных аналогов вирусных белков, обеспечивающие высокую чувствительность, эффективность и безопасность методов диагностики и средств профилактики.

### **Степень разработанности проблемы.**

Несмотря на значительные успехи, 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., Зубаировым М.М., Орловым А.А., Кушниром А.Т., Жигалевой О.Н., Пантюшенко М.С., Перепечко В.С., Соковых Л.И., Романовой В.П., Серeda 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 (Львов Д.К. и др., 2010; Аканина Д.С. и др., 2014; Чубухова О.В. и др., 2008; Мухаметханов Е.Э. и др., 2010; Силко Н.Ю. и др., 2013; McCauley JW., et al. 2011 и др.), появлением новых реассортантов (Усачев Е.В., 2005; Lomniczi B.et al., 1998; Borucki MK. Et al., 1999; Bowen MD.et al., 2001; Gu M.et al., 2007; Bird B. et al., 2009; Perozo F. et al., 2012; Saira K., 2013; Wong FYK. et al., 2015 и др.). Несмотря на значительное количество работ в области вакцинопрофилактики ЛДР и гриппа птиц необходимость эффективной, безопасной, «идеальной» вакцины остается актуальной. Сходство организации генома, функций основных вирусных белков представителей семейств *Bunya-*, *Orto-*, *Paramixoviridae* (White J.et al., 2008; Terasaki, K. et al., 2011; Wanga Jing-Yu et al., 2013; и др.) 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 (Pedro B.et al., 2011; Bales J. M. et al., 2012 и др.).

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.

**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, инактивированной вакцины против ЛДР;

- отработать лабораторные методы и подобрать лабораторную модель для контроля качества вирусного сырья; безвредности, антигенности и иммуногенности препаратов инактивированного антигена вируса лихорадки долины Рифт;

- отработать методы повышения антигенной и иммуногенной активности инактивированного 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.

**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 G<sub>n</sub> 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 G<sub>n</sub>, синтезируемому *in vivo* и *in vitro*, выявлять в различных серологических реакциях, в том числе иммуноцитохимическим методом, антигенные детерминанты гликопротеина G<sub>n</sub> 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<sub>G<sub>n</sub>/G<sub>c</sub></sub> 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.

**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 инактивированного 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 инактивированного антигена вируса ЛДР.

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

**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).

**Публикации.** 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.

**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 применения DIVA

концепции с использованием непрямого ТФ ИФА на основе рекомбинантного NP и соответствующих МКА.

**Личный вклад соискателя.** Основной объем исследований проведен автором самостоятельно. Личный вклад автора в исследования, вошедшие в диссертацию, был определяющим. Соискатель, как научный сотрудник ГНУ ВНИИВВиМ 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.

**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.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИСЛЕДОВАНИЯ**

### ***Материалы и методы.***

***Материалы.*** Вирусы, антигены, референс-сыворотки, иммуноасцитические жидкости, сахарозо-ацетоновые антигены вирусов, используемые в работе, получены из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

***Животные и культуры клеток.*** СПФ РЭК 10-11-суточного возраста; мыши белые различных возрастов: линии BALB/c и беспородные; кролики породы Шиншилла массой 2-3 кг; петухи породы Леггорн массой 2,5-3 кг; овцы Романовской породы и Прекос, массой 35-40 кг; перевиваемые линии клеток (каталог ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии): MDCK, катал. № 32; CV-1, катал. № 25; ПСГК, катал. № 60; ВНК-21/13, катал. № 52, миеломную линию клеток Sp 2/0-Ag 14.1 (Sp 2/0).

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

*Гибридомы.* Полученные ранее в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии клоны гибридом, продуцирующие МКА к гемагглютиниру Н5 и Н7, нуклеопротеину, вирусов: гриппа птиц; парамиксовирусов птиц, в том числе б. Ньюкасла, лихорадки долины Рифт; к фосфопротеину р30 вируса АЧС, восстанавливали, реклонировали, размножали. Полученные специфические МКА использовали в работе.

*Рекомбинантные плазмиды и рекомбинантные белки.* Рекомбинантные плазмиды и белки любезно предоставлены сотрудниками ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии Казаковой А.С.; Каталымовым А.С.; Власовой Н.Н.; Иматдиновым И.Р. Препараты рекомбинантных белков р30 вируса АЧС, Gn и NС вируса ЛДР, NP вируса гриппа А очищены методом металло-хелатной аффинной хроматографии. Использовали следующие рекомбинантные плазмиды:- рТТ9/ASFVp30 из клеток E.coli штамма BL21(DE3)pLysS (Promega), очищенной методом щелочного лизиса и фенольной экстракции (Казакова А.С.); рСI-neoGn2/2 и рСI-neoGc3/3 под контролем CMV-промотора (Иматдинов И.Р.); рЕТ32b/ЛДР/NP/3/9b клеток E.coli штамм KRXc T7 промотором (Иматдинов И.Р.); Vp7 вируса блютанга (Каталымов А.С.); рInfNP, рInfNA5 из клеток E.coli штамма BL21(DE3)pLysS (Promega).

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

*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).

*Оборудование.* Для проведения боксовых работ с культурами клеток использовали комплект оборудования, необходимый для проведения работ по культивированию культур клеток, гибридной технологии, биохимических, иммунологических исследований, иммуноферментного анализа использовали необходимый комплект оборудования, освещенных в методических рекомендациях [Егоров А.М., 1991].

**Методы.** *Получение культурального вирусодержащего материала.* Проводили по общепринятой методике часовой адсорбцией вируса при 37°C и инкубированием при той же температуре в CO<sub>2</sub> инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> и 96% влажности. Титр инфекционной активности вирусодержащего материала определяли по методу Рида и Менча.

*Определение концентрации белка.* Определение белка проводили по методу Lowry O.H. et al. (1951).

*Иммунизация мышей.* Мышей линии BALB/c, нелинейных мышей массой 18-25 г иммунизировали соответствующим антигеном по разработанным схемам. Внутриселезеночную иммунизацию мышей проводили под эфирным наркозом методом препаративного вмешательства в асептических условиях.

*Скрининг гибридных антителопродуцентов.* Исследование культуральных жидкостей клонов гибридом 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 (нТФ ИФА) по общепринятой методике, на полистироловых пластинах (Cliniplate; Dynatech microelisa; Nunc), основываясь на стандартных процедурах твердофазного иммуноферментного анализа.

*Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител.*

*Определение классов и подклассов моноклональных иммуноглобулинов* определяли с использованием набора для изотипирования антител мыши "ISO-1" ("Sigma", США), согласно прилагаемой инструкции.

*Электрофоретический анализ и иммуноблоттинг.* Определение полипептидной специфичности моноклональных антител, специфичности рекомбинантных белков проводили по методу, описанному Laemli U.K. Работу выполняли совместно с Казаковой А.С. Молекулярные массы рассчитывали, используя компьютерную программу «Molmas.bas».

*Метод непрямого ингибирования ТФ ИФА.* Проводили методом непрямого ингибирования ТФ ИФА на основе вирусного антигена и лизата клеток *E.coli* по стандартной методике. Результат реакции учитывали спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

*Конкурентный ИФА для определения эпитопного картирования.* Изучение топографии эпитопов на антигенах гликопротеина вируса ЛДР проводили на основе меченных пероксидазой МКА различных клонов с немечеными МКА по стандартной методике. В качестве специфического антигена использовали очищенный вирусный антиген поверхностных белков и рекомбинантный аналог белка Gp вируса ЛДР.

*Микровариант реакции нейтрализации.* Для выявления вируснейтрализующих свойств, полученных МКА и сывороток, использовали микрометод реакции нейтрализации с постоянной дозой вируса  $100 \text{ ТЦД}_{50/\text{см}^3}$  и определением титра ВН антител. Титром ВН антител считали наибольшее разведение сыворотки, дающее 75% задержку развития специфического ЦПД.

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

*Непрямой вариант иммуноферментного анализа для выявления антигена.* Непрямой метод ТФ ИФА (нТФ ИФА) для выявления специфических антител проводили по стандартной методике. (Егоров А.М. и др., 1991). Относительное

содержание специфических антител в ЕУ ИФА определяли по формуле:  $EU = [(\sum O_{\text{Пробы}} - \sum O_{\text{ПК}^-}) / (\sum O_{\text{Стандарт}} - \sum O_{\text{ПК}^-})] \times 100$ . Стандарт – положительная гипериммунная сыворотка. Концентрация антител в пределах до 30 – отрицательные сыворотки; 30-40 – сомнительные; более 40 – положительные.

*Определение функциональных свойств методов ТФ ИФА.* Использовали рекомендации, указанные в руководстве МЭБ (2014, часть 2,1,14), определяя аналитическую чувствительность, активность и диагностическую чувствительность метода.

*Определение иммунного статуса и цитокинового профиля.* Работу проводили совместно с сотрудниками лаборатории культур тканей ФГУ «НИИ вирусологии им. Ивановского» Мезенцевой М.В., Руссу Л.И. 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 Van Gelder R.N. et al (1990). В работе были использованы пары мышинных праймеров для следующих цитокинов: ИФН- $\alpha$ , ФН- $\gamma$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- $\alpha$ . Все олигонуклеотиды получены из ЗАО «Синтол» (г. Москва). В качестве положительного контроля использовали праймеры для  $\beta$ -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).

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 по общепринятой методике. Субпопуляции лимфоцитов анализировали по наличию на их поверхности специфических маркеров с использованием соответствующих специфических моноклональных антител (фирма «Сорбент», Москва). Относительное



содержание лимфоцитов учитывали на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, USA).

*Нуклеотидное секвенирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей.* Работу проводили совместно с Власовой Н.Н., Казаковой А.С., Иматдиновым И.Р. Нуклеотидное секвенирование проводили при помощи генетического анализатора ABI 3730 (Applied Biosystems, USA) и набора терминаторов цепи Big Dye v.3.1 (Applied Biosystems, USA) согласно инструкции производителя. Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи пакета прикладных программ Mega 4.0.2., BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3. по методу Clustal W.

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

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

*Совершенствование технологии получения антител заданной специфичности.* Ввиду трудности получения традиционными методами отдельных вирусных белков и/или их фрагментов в чистом виде, нами для получения моноспецифических и моноклональных антител (МКА) в качестве источника отдельных вирусных белков и/или их фрагментов использованы рекомбинантные ДНК-плазмиды, кодирующие целевой белок (или его фрагмент) и соответствующие рекомбинантные аналоги белков вируса ЛДР, гриппа птиц, блютанга, АЧС.

*Изучение антигенных свойств рекомбинантных плазмид и рекомбинантных белков.*

Функциональную активность полученных рекомбинантных белков оценивали по способности избирательно взаимодействовать со специфическими антителами, а также вызывать иммунный ответ у лабораторных животных полученными ДНК-конструкциями и рекомбинантными белками.

Установлено, что рекомбинантные белки – аналоги: Gn/Gc и NP вируса лихорадки долины Рифт; NP вируса гриппа А, полученные *in vitro* в прокариотической системе экспрессии, обладают антигенными свойствами вирусных белков - взаимодействуют с антителами, полученными к вирусному антигену, что позволило в дальнейшем использовать их в качестве специфических антигенов при получении моноспецифических сывороток и МКА; конструировании тест-систем иммуноанализа.

*Получение и характеристика моноспецифических сывороток на основе использования рекомбинантных конструкций и рекомбинантных белков.*

Изучена способность ДНК конструкций, кодирующих Gn/Gc вируса ЛДР и соответствующих рекомбинантных белков индуцировать развитие иммунного ответа, определяемого по уровню продукции специфических антител, активации и пролиферации Т-клеток и В-клеток. Для этого двум группам мышей вводили внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра в дозе 50 мкг/мышь ДНК-конструкции pCI-neo/Gc3/3 и pCI-neo/Gn/2/2 на ЗФР (рН 7,2-7,4) и в агарозном гидрогеле. Пробы крови отбирали через 3, 7, 14, 30, 45 дней после первого введения. Динамика накопления специфических антител в результате ДНК-иммунизации и последующего введения рекомбинантного белка представлены на рисунке 1.

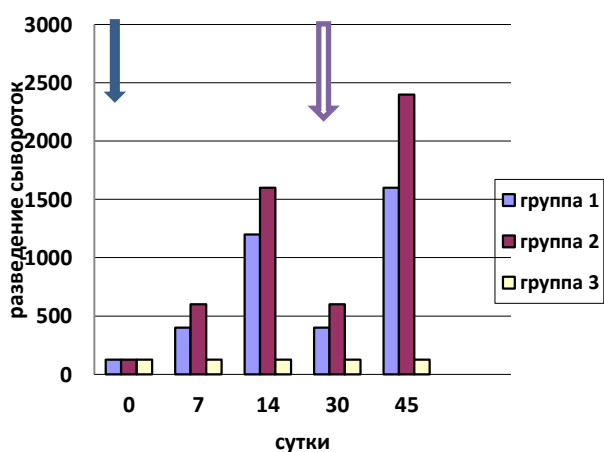


Рисунок 1 –Динамика накопления специфических антител в результате ДНК-иммунизации и последующего введения рекомбинантного белка. Группам мышей вводили: 1 - плазмидную ДНК pCI-neoGn и pCI-neoGn/Gc на ЗФР 7,2-7,4; 2 – плазмидные ДНК pCI-neoGn и pCI-neoGn/Gc, в агарозном геле; группа 3 –плазмиду pCI-neo; через 30 суток – рекомбинантные белки Gn/Gc на целлюлозе. Стрелками указаны сроки введения препаратов.

Установлено, что рекомбинантные плазмиды при однократном внутримышечном введении обеспечивают экспрессию генов и синтез белков Gn/Gc, косвенным подтверждением которого явилось наличие в сыворотке

крови иммунизированных мышей специфических антител, выявляемых начиная с 7 суток. Более высокие титры антител во 2 группе свидетельствуют, что агарозный гидрогель не только защищает ДНК, но и может выступать в роли адьюванта. К 30 суткам после инъекции отмечали снижение уровня антител. Введенные рекомбинантные белки Gn/Gc на фоне снижения уровня антител в сыворотке крови иммунизированных мышей вызывали увеличение титра специфических антител (в 4 раза и более).

Эффективность разработанной схемы иммунизации: праймирование иммунной системы рекомбинантной плазмидой, несущей вставку гена, кодирующего целевой белок с последующим 3-4 кратным введением рекомбинантного белка, определена при получении моносpezifических сывороток к иммунодоминантным диагностически значимым структурным белкам вирусов гриппа птиц, блютанга, АЧС, антитела которых взаимодействовали в различных серологических реакциях с соответствующим рекомбинантным белком, нативным антигеном гомологичного вируса, и не вступали в реакцию с антигенами гетерологичных вирусов и нормальным антигеном. Также установлено, что при использовании гетерологичной прайм-бустерной иммунизации титр специфических антител в непрямом ТФ ИФА 1:3200-1:12800, что значительно выше, чем при введении только рекомбинантного белка (рекPrP КРС - 1:2000; VP7 вируса блютанга) или вирусных антигенов (инактивированный антиген вируса ЛДР –1:2400-3600).

*Получение и характеристика моноклональных антител к гликопротеину Gn вируса лихорадки долины Рифт.* Совершенствование гибридной технологии получения МКА узкой направленной специфичности, в первую очередь, заключалось в использовании ДНК-конструкций и рекомбинантных белков для иммунизации доноров иммунных лимфоцитов.

При изучении иммунного ответа на рекомбинантные плазмиды, содержащие вставку полноразмерного *gn*-гена установлено, что, введенные внутриселезеночно, они индуцируют не только синтез высокого уровня специфических антител, достигающих значения 1:1200-2400 на 3-4 сутки после введения, но также вызывают активацию Т- и В-лимфоцитов. При этом,

иммунный статус мышей линии BALB/c после ДНК-иммунизации остается в пределах нормы, так как иммунорегуляторный индекс животных был выше 1,0, но не превышал значений 3,5. Методом ИЦХ ИФА на основе МКА (фирмы ООО «Сорбент» г. Москва) показана экспрессия дифференцировочных CD4, CD8, CD20 антиген-распознающих рецепторов на поверхности спленоцитов иммунных мышей (3-4сутки после иммунизации). Однако опыты гибридизации иммунных спленоцитов мышей после однократной внутриселезеночной иммунизации и клеток миеломной линии показали, что полученные клоны гибридных клеток продуцируют в большинстве своем (64-70%) специфические МКА относящиеся к IgM изотипу.

С целью повышения процента клонообразования перед опытом гибридизации проводили сенсibilизацию клеток родительской линии Sp2/0-14.1 рекомбинантным белком Gn. Однако эта процедура не привела к значительному увеличению процента клонообразования (77%). Выход положительных клонов оказался значительно выше - 81%, чем при получении МКА к вирусным антигенам: гемагглютинирующему вирусу гриппа птиц подтипа H5 – 20%; нуклеопротеину вируса ЛДР – 44%. Гибридомы, полученные в результате усовершенствованного метода по морфологии и культуральным свойствам не отличались от таковых, полученных традиционным методом иммунизации белковым антигеном.

Учитывая факт успешного использования сенсibilизированных полимерных микросфер для обнаружения малых количеств антител в различных субстратах, разработан чувствительный экспрессный метод латекс-агглютинации на основе рекомбинантных белков для предварительного скрининга синтеза МКА полученными гибридами. Метод успешно апробирован при получении МКА к р30 вируса АЧС и МКА к Gn вируса ЛДР. Результаты РЛА коррелировали с результатами ( $r=0,87$ ) традиционно используемых - нТФ ИФА и ИЦХ ИФА. Преимуществом разработанного метода является его простота, быстрота получения результатов и экономия используемых реагентов, что особенно важно в период проведения начального скринирования.

В результате проведения стандартных процедур гибридной технологии, изучения иммунохимических свойств МКА были отобраны клоны 4В4; 5С12; 4А5; 2Н4, стабильно продуцирующие МКА к гликопротеину G<sub>n</sub>, взаимодействующие с очищенными рекомбинантным белком G<sub>n</sub> и антигенами вируса ЛДР. Полученные МКА к G<sub>n</sub> не вступали в реакцию с рекомбинантным нуклеокапсидным белком; не реагировали перекрестно с антигенами вирусов - представителями других родов семейства *Bunyviridae* -Акабане, Найроби, Арумовот.

Полученные данные позволили разработать схему технологии получения в короткие сроки (2-3 месяца) МКА к отдельному генетически охарактеризованному полипептидному продукту, что обеспечивает широкие возможности ее использования для получения необходимых иммунореагентов с целью конструирования диагностических иммуноферментных тест-систем нового поколения для индикации и идентификации возбудителей новых и особо опасных инфекций, в том числе экзотических.

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

*Методы молекулярной диагностики для выявления генома вирусов ЛДР и гриппа птиц H5N1.* Разработанные совместно с коллективом авторов тест-системы на основе ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией на основе праймеров, комплементарных консервативным участкам гена NP, HA5 и N1, рассчитанных по результатам анализа нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса гриппа птиц подтипов H5 и N1, имеющихся в базе данных GenBank (USA), позволяют выявлять в инфицированном материале геном вируса, его подтиповую принадлежность к HA5 и N1, а также дифференцировать вирус H5N1 от других подтипов вируса гриппа птиц.

На основе анализа имеющихся в базе данных GenBank (USA) нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса ЛДР были подобраны олигонуклеотидные праймеры комплементарные консервативному участку *nss*-гена S-сегмента РНК. Разработанная, с коллективом авторов, двухраундовая ОТ-ПЦР позволяет идентифицировать гены эпизоотического штамма

«Энтеббе» и аттенуированных штаммов «1974-ВНИИВВиМ», «RVF(s)113» вируса ЛДР в пробах вирусосодержащего материала.

Перекрестная реактивность в серологических реакциях, не позволяющая надежно дифференцировать вирусы семейства *Bunyviridae* внутри рода; общность чувствительных с/х животных; экзотичность для нашей страны, определили необходимость создания системы дифференциальной молекулярной диагностики вируса ЛДР. Разработана, совместно с коллективом авторов, мультиплексная ОТ-ПЦР в режиме реального времени, которая способна выявлять и дифференцировать геномы вирусов болезни Найроби и ЛДР между собой и другими представителями семейства *Bunyviridae*. Рассчитанное значение аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для вируса болезни Найроби составило  $2,2 \pm 0,2 \lg$  ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup></sub>, для вируса ЛДР -  $2,5 \pm 0,3 \lg$  ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup></sub>.

Однако короткий период виремии при ГП и ЛДР осложняет применение данных методов генодиагностики в полевых условиях. Для ранней диагностики инфекционных болезней широко используются методы ИФА, которые являются надежными, быстрыми, чувствительными и специфичными.

*Использование моноклональных антител и рекомбинантных белков для индикации и идентификации антигенов вирусов лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла.* Сложность получения СПФ РЭК, особенно в случае возникновения эпизоотий ГП и НБ определила необходимость разработки альтернативной лабораторной модели идентификации *in vitro* ГП и НБ. При изучении репродукции вирусов ГП и НБ установлено, что высоковирулентные (велогенные) штаммы/изоляты вирусов ГП и НБ без предварительной адаптации вызывают полную деструкцию монослоя чувствительных культур клеток в течение 24-72 часов после заражения. Низковирулентные (лентогенные) штаммы этих вирусов в первом пассаже не вызывают выраженную дегенерацию инфицированных клеток линии ПСГК, соответственно, в течение 5-10 суток после заражения (срок наблюдения).

Установлено при сравнительном изучении репродукции и накопления вирусов ГП и НБ в культуре клеток ПСГК и СПФ РЭК, результаты которого представлены в таблице 1, что различие титров инфекционной активности, составляет: для вирулентных (веложенных) штаммов и изолятов вирусов ГП и НБ не более 1,5-2,0lg ИД/50, для низкопатогенных (лентогенных) штаммов - более 3 lg ИД/50.

Таблица 1

Инфекционная и антигенная активность вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла в различных системах культивирования в зависимости от вирулентности штаммов/изолятов

Наименование штамма		Титры инфекционной и антигенной активности (n=3)				Разница lgЭЛД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> / lgТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>
		ЭЭЖ КЭ lgЭЛД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	ЦПД lgТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	ИЦХ ИФА lgТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	РГА ЭЭЖ/кул.ж ГAE/см <sup>3</sup>	
Вирус гриппа птиц	А/утка/Н5N2	7,5±0,5	5,0-5,5	5,0-6,0	128-256/ 32-64	2,0-1,5
	А/крачка/Н5N3	7,0±0,4	3,5-4,0	3,0-4,0	256-512/ 64-158	<b>4,0-3,0</b>
	А/кур./Н5N1	8,0±0,6	6,5-7,0	6,5-7,0	64-128/ 32-64	1,5-1,0
	А/утка/Н1N1	7,0±0,5	3,5-4,0	3,0-3,5	256-512/ 16-32	<b>4,0-3,5</b>
	А/цыпл./Н7N7	8,0±0,3	6,5-7,0	6,5-7,0	64-128/ 32-64	1,5-1,0
	А/цыпл./Н9N2	7,0±0,5	5,0-6,0	5,0-5,5	256-512/ 32-64	2,0-1,5
	Изолят (цыпленок)**	7,5±0,4	6,5-7,0	5,5-6,0	128-256/ 16-32	2,0-1,5
Вирус болезни Ньюкасла	Т-53 II генотип	7,5±0,7	5,0-6,5	5,5-6,5	1024/ 128-256	2,0-1,0
	Ла-Сота II генотип	8,5±0,5	-	Окрашиван. отдельных клеток	512- 1024/0	<b>8,5</b>
	Изолят (голубь)* IV генотип	8,0±0,3	5,5-6,5	6,0-6,5	256-512/ 64-128	2,0-1,5
	Изолят (голубь)* VI генотип	8,5±0,2	6,0-6,5	6,5-7,0	512-1024/ 128-256	2,0-1,5

Примечание: \* - выделен вирус болезни Ньюкасла; \*\* - выделен вирус гриппа птиц Н5N1 во время мониторинговых исследований, «-» отрицательный результат

Это позволяет дифференцировать высоковирулентные (веложенные) и низкопатогенные (лентогенные) штаммы/изоляты вирусов ГП и НБ *in vitro*. Также установлена прямая корреляции между деструктивными изменениями в

чувствительной культуре клеток, выявлением антигенов вирусов методом ИЦХ и уровнем вирулентности штамма (изолята); коэффициент корреляции составил 0,89 (при  $p \leq 0,05$ ). Предложенный прямой метод ИЦХ ИФА с использованием чувствительных перевиваемых культур клеток позволяет выявлять антигенные детерминанты диагностически значимых вирусных белков: гликопротеинов и нуклеопротеина ЛДР, нуклеопротеина и гемагглютининов Н5 и Н7 ГП, нуклеопротеина НБ в первые 10-18 часов после инфицирования. При изучении репродукции вируса ЛДР в культуре клеток ВНК-21/13 установлено, что антигены вирусных белков ИЦХ методом могут быть выявлены через 8-10 часов после заражения в виде специфического окрашивания: ядра (белка NSs), что является отличительным признаком вируса ЛДР, цитоплазмы (NC), перинуклеарной зоны и полярного окрашивания (Gn/Gc) инфицированных клеток. Принципиальное отличие данного метода от других методов иммунодиагностики заключается в том, что он позволяет по характеру окрашивания субстрата в зараженных клетках сделать заключение о репликации, локализации определенных вирусных белков в различных структурах клетки. Предложенный метод, являясь экономичным, высокочувствительным и специфичным, может быть рекомендован для ранней диагностики вирусов особо опасных болезней и мониторинга их распространения.

*Разработка тест-системы на основе моноклональных антител для идентификации гриппа птиц и болезни Ньюкасла.* Разработанный чувствительный специфичный прямой двухсайтовый сэндвич-вариант ТФ ИФА на основе неконкурирующих между собой пар МКА к нуклеопротеинам указанных вирусов позволил создать тест-систему ИФА для выявления и одновременной дифференциации гриппа птиц и болезни Ньюкасла в полевых материалах. Разработана соответствующая нормативно-техническая документация, утвержденная в установленном порядке заместителем руководителя Россельхознадзора и организовано производство «Набора препаратов на основе МКА для дифференциальной диагностики гриппа птиц и



болезни Ньюкасла». Применение «Набора препаратов...» обеспечивает выявление антигенов вируса и одновременно дифференциацию гриппа птиц и болезни Ньюкасла в пробах суспензии внутренних паренхиматозных органов и тампонных пробах (носоглоточных и клоакальных смывах) от инфицированной и больной птицы не зависимо от подтипа и пато- и генотипа соответствующего вируса, а также в пробах, содержащих смесь этих антигенов, что практически невозможно в РГА. «Набор препаратов...» внедрен в ветеринарную практику с 2006 года и был использован в период эпизоотий гриппа птиц подтипа H5 в нашей стране.

Применение «Набор препаратов...» и прямого сэндвич-варианта ТФ ИФА на основе МКА к антигенным детерминантам гемагглютинина 5 и 7 подтипов вируса гриппа птиц в период 2005-2012 гг. позволило выявить циркуляцию вируса б. Ньюкасла и гриппа, среди диких птиц в Центральном регионе РФ. В 14% проб внутренних органов и экскретов диких птиц выявлен антиген НБ, в 88% проб -NP вируса ГП, из них 94% - положительно реагировали с МКА к НА5 подтипа и 71% - с МКА к НА7. Выявление антигенов указанных вирусов в пробах экскретов диких птиц указывает на высокую вирулентность циркулирующих вирусов в их популяции. Использование пары МКА к нуклеопротеину НБ позволило идентифицировать вирусные антигены в пробах инфицированного материала от голубей не только II, но IV генотипа и VI генотипа (изоляты «Юхнов» и «Уголок Дурова», ФГБУ ЦНМВЛ), относящихся ко второму генетическому классу ПМВ-1.

*Разработка реакции непрямой гемагглютинации на основе моноклональных антител для выявления антигенов вируса лихорадки долины Рифт. Для осуществления предварительного контроля антигенности вирусного сырья в процессе изготовления вирусного сырья для вакцин против ЛДР разработана реакция непрямой гемагглютинации на основе формализированных и танизированных эритроцитов барана и МКА, специфичных к Gp вируса. Оптимальная доза сенсibilизации эритроцитов барана IgМКА составила 2-3 мкг/см<sup>3</sup>, которая обеспечивала высокую чувствительность метода при*

отсутствии спонтанной агглютинации. Результаты изучения динамики накопления иммунодоминантных белков вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» в культуре клеток ВНК-21/13 с использованием разработанной РНГА и ТФ ИФА на основе МКА к нуклеопротеину показали, что выявление и накопление антигенов указанных белков происходит в период 48-72 часов культивирования и составляет в ТФ ИФА NP 11,6-11,9  $\log_2$ ; Gn/Gc-11,0-11,7  $\log_2$ ; РНГА 8,6-9,4  $\log_2$  и удерживается практически на этом уровне еще в течение суток. Сравнительное изучение специфичности и чувствительности РНГА и нТФ ИФА показало, что чувствительность нТФ ИФА в 4-8 раз превышает РНГА; однако по специфичности результаты реакций совпадали на 98%. Таким образом РНГА на основе МКА к гликопротеину вируса ЛДР и ДАС ТФ ИФА на основе МКА к NP и Gn вируса ЛДР могут быть использованы для контроля накопления антигенной активности вирусного сырья.

*Разработка средств серологического мониторинга лихорадки долины Рифт, гриппа птиц, болезни Ньюкасла.* Одной из задач исследований следующего раздела работы являлись разработка различных вариантов ТФ ИФА на основе использования стандартизованных рекомбинантных белков: гесGn, гесGc, гесNC вируса ЛДР, гесNP вируса гриппа А, полученных в прокариотической системе экспрессии и соответствующих МКА.

Оптимальные параметры постановки нТФ ИФА определяли путем шахматного титрования по общепринятой методике. Оптимальная доза сенсibilизации планшет составила: вируса ЛДР гесGn, гесGc 200 нг/лунку, 150 нг/лунку гесNC; гесNP вируса ГП 125 нг/лунку; разведение специфического антигена 1:200. В качестве препарата для сравнения использовали мозговые сахарозо-ацетоновые антигены вируса ЛДР, эмбриональные антигены вируса гриппа птиц и гетерологичных вирусов, а также частично очищенные концентрированные культуральные антигены вируса ЛДР. В качестве антивидового конъюгата использовали пероксидазные конъюгаты белка G и IgG козы к Ig мыши.

Отработку параметров ТФ ИФА для выявления специфических антител в одном разведении проводили с использованием 20 проб сывороток животных, имеющих различные уровни антител к исследуемым вирусам, предварительно определенные в РЗГА (ГП, БН) и РЗНГА (ЛДР). Установлено, что наиболее сильную корреляционную взаимосвязь ( $r=0,95$  для ГП;  $0,97$  - НБ;  $0,93$  - ЛДР) имели исследуемые сыворотки крови в разведении 1:50, которое, впоследствии, использовали в качестве рабочего. Для определения позитивно-негативного порога исследовали заведомо отрицательные сыворотки в разведении 1:50. Сыворотки считали отрицательными при значении соотношения  $S/P < 0,2$ , положительными  $-> 0,3$ . Также установлено, что ОП<sub>405</sub> высокоактивных сывороток в непрямом ТФ ИФА находилась в пределах  $1,98-2,15 \pm 0,07$  (титр в РЗГА 1:1024-1:2048) и для сывороток с низкой активностью –  $0,54-0,62 \pm 0,03$  (титр в РЗГА 1:64-1:128).

Результаты изучения чувствительности и специфичности нТФ ИФА на основе рекомбинантных белков и специфических антигенов; специфичности сывороток и ИАЖ к вирусу ЛДР представлены в таблице 2.

Установлено, что антитела сывороток и иммуноасцитических жидкостей, полученные на цельновирионные антигены вируса ЛДР специфически взаимодействовали с рекомбинантными белками Gn, Gc и Nc, полученными в прокариотической системе экспрессии. Определена перекрестная реактивность рекомбинантных белков, нативного вирусного антигена и антител специфических сывороток, полученных к нативным вирусным антигенам и рекомбинантным белкам, синтезированным *in vitro* и *in vivo*.

Полученные результаты показали преимущество использования рекомбинантных белков для систем иммуноанализа, обеспечивающих повышение чувствительности метода, его безопасности и снижение фонового уровня реакции. О высокой специфичности метода свидетельствовало отсутствие перекрестных реакций при исследовании нормальных и гетерологичных сывороток. Установлено, что ОП<sub>405</sub> и концентрация антител в сыворотках крови после заражения вирусом ЛДР (животные реконвалесценты) или вакцинации живой вакциной (концентрация антител в ЕУ ИФА – 160-

220±0,2) в 3-4 раза превышали таковые сывороток к инактивированному антигену (концентрация антител в ЕУ ИФА – 51±0,2), что дает возможность, используя непрямой ТФ ИФА на основе рекНС, дифференцировать инфицированных животных от вакцинированных инактивированным антигеном или вакциной, не содержащей NS белок.

Таблица 2

Выявление специфических антител в сыворотках крови животных в непрямом твердофазном иммуноферментном анализе

Исследуемые сыворотки/иммуноген/рабочее разведение	Антигены/ концентрация антител в ЕУ ИФА(n=3)								
	ЛДР					САА гетерогенных вирусов			ГриппА recNP
	recGn	recGc	recNC	САА	Sag	Арумовот	Найроби	Акабане	
SS мышей/ рекДНКGn/Gn/1:2 тыс.	<b>215±0,1</b>	<b>110±0,2</b>	0*	<b>158±0,4</b>	<b>130±0,3</b>	0*	0	0	0
SSмышей/рек.плазм/рек. белок Gn1:2 тыс.	<b>280±0,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>215±0,2</b>	<b>109±0,1</b>	0	0	0	0
SS мышей /инактивир антиген/1:2 тыс.	<b>95±0,4</b>	<b>74±0,2</b>	<b>51±0,5</b>	<b>152±0,6</b>	<b>97±0,4</b>	19±0,4	17±0,4	17±0,2	0
SS мышей/живая в-на/ 1:2 тыс.	<b>100±0,2</b>	<b>154±0,4</b>	<b>160±0,2</b>	<b>158±0,1</b>	<b>125±0,4</b>	15±0,5	16±0,2	20±0,5	0
SS овцы К++/вирус ЛДР 1:1,5 тыс.	<b>145±0,5</b>	<b>134±0,5</b>	<b>220±0,6</b>	<b>100±0,1</b>	<b>85±0,5</b>	0	19±0,2	0	0
ИАЗ <sub>ЛДР</sub> /1:2 тыс.	<b>157±0,3</b>	<b>167±0,4</b>	<b>202±0,2</b>	<b>140±0,2</b>	<b>160±0,4</b>	20±0,4	16±0,30	16±0,2	0
ИАЗ <sub>Арумовот</sub> /1:2 тыс	15±0,4	0	0	19±0,2	20±0,4	<b>184±0,7</b>	18±0,1	19±0,5	0
ИАЗ <sub>Найроби</sub> /2 тыс.	16±0,3	17±0,4	0	16±0,2	18±0,5	18±0,10	<b>269±0,4</b>	17±0,3	0
ИАЗ <sub>Акабане</sub> /1:2 тыс.	17±0,4	15±0,1	0	18±0,3	16±0,5	0	15±0,3	<b>161±0,12</b>	0
МКА к Gn ЛДР/1:500	<b>210±0,1</b>	0	0	<b>104±0,2</b>	<b>160±0,4</b>	0	0	0	0
МКА к NS ЛДР/1:2 тыс.	0	0	<b>340±0,1</b>	<b>130±0,4</b>	<b>160±0,2</b>	19±0,1	0	0	0
МКА к NP гриппа А/ 1:2 тыс.	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>267±0,2</b>
S овцы К-/1:200.	0	0	0	15±0,1	18±0,5	19±0,2	0	0	0
S мышей К-/1:250	0	0	0	18±0,2	0	0	0	15±0,3	0

Примечание: \* -в таблице представлены данные концентрации антител в международных единицах ИФА (ЕУ ИФА); 0\* - обозначен уровень антител менее 15 ЕУ ИФА.

Подтверждением данного заключения, в отсутствии полевых сывороток к вирусу ЛДР, стали результаты исследования 334 проб сыворотки крови домашней птицы (мелких подворных хозяйств Можайского района Московской области), вакцинированной инактивированной вакциной против ГП 5 подтипа и сыворотки крови 28-суточных цыплят-реконвалесцентов, экспериментально зараженных высоковирулентным ВГП (H5N1). Результаты исследований,

представленные в таблице 3, показали, что разработанные различные форматы ТФ ИФА по специфичности и чувствительности не уступали коммерческому «Набору для выявления специфических антител к вирусу гриппа в сыворотке крови птиц» фирмы ОАО НПП «Авивак», и совпадали с результатами РТГА; использование рекNP гриппа А в качестве специфического антигена позволило при низком фоновом уровне увеличить чувствительность непрямого метода ТФ ИФА в 2-4 раза.

Таблица 3

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

Исследуемые сыворотки	концентрация антител в ЕУ ИФА В непрямом ТФ ИФА (n=3)		% конкуренции (n=3)		РТГА (log <sub>2</sub> ) (n=3)
	Антигены				
	ЭЭЖ ЭК		Рек NP грипп А		
	нТФ ИФА	ОАО Авивак	нТФ ИФА	кТФ ИФА	
NS кур	0	0	0	0	0
SS стандарт	100±0,4	100±0,2	100±0,2	89±0,3	9,2±0,12
SS свиней к H5N1**	80±0,4	50±0,1	98±0,3	99±0,1	9,7±0,3
Гипериммунная SS к ВНБ*	20±0,6	17±0,3	0	0	9,4±0,2*
Гипериммунная SS к ВГП	110±0,7	90±0,3	148±0,2	98,3±0,1	10,4±0,1 5
SS кур реконвалесцент. (n=10)	95±0,1	96±0,5	158±0,6	98,7±0,5	11,8±0,4
Объединенные пробы сывороток кур, привитых инактивированной вакциной против гриппа (Можайский район, Московской области)					
с. Бородино (n=16)	96±0,2	87±0,2	120±0,2	98,5±0,2	10,4±0,1
с. Иващино (n=10)	98±0,7	93±0,4	140±0,3	100±0,1	10,8±0,5
г. Троицк (n=30)	85±0,5	79±0,3	76±0,5	83±0,5	8,6±0,12
с. Голеново (n=20)	79±0,7	72±0,1	70±0,1	81±0,2	8,3±0,5

Примечание: p<0,05; SS ГП– иммунная сыворотка птиц, переболевших ГП; SS НБ– иммунная сыворотка птиц, переболевших НБ \*-в реакции использовали антиген вируса НБ; \*\* -для выявления комплекса антиген-антитело использовали конъюгат протеина А.

Установлено, что в 80% проб сывороток крови вакцинированных птиц из предприятий закрытого типа титры в РТГА - 1:256-512, вирусспецифических антител в нТФ ИФА 1200-2400; у гусей и уток - от 1:32 до 1:128 и 1:300-1:800,

соответственно. В пробах сывороток из подворий открытого типа титры антител находились в пределах 1:1200-1:2400 до 1:3600-1:9192, соответственно.

Подобные результаты получены при проведении 2007-2009 гг. серологического мониторинга распространения ГП и НБ на территории лесостепной зоны Алтайского края и расположенных в Центральных областях Европейской части РФ Госкомплексов «Завидово» и «Таруса». Из исследованных 460 проб сывороток от 29 видов дикой водоплавающей, береговой и синантропной птицы, специфические антитела к вирусу ГП обнаружены в 66,7% проб сывороток крови птиц; 45,8% проб от диких птиц и (5 видов) синантропной птицы имели титр АТ к ВГП в пределах 1:2400-6400. Из 49 проб сыворотки крови от диких свиней 59% проб положительные к вирусу гриппа А. Антитела к ВБН были обнаружены в 63% проб сывороток практически у всех исследуемых видов птиц. Из них 40% проб имели титр 1:3200-1:6400. Причем в отдельных районах Алтайского края титр достигал 1:7000-1:8000. Наличие высоких титров специфических антител к ГП и НБ в сыворотках крови большинства представленных видов птиц и антител к гриппу А в сыворотках крови диких свиней может служить подтверждением участия диких животных в возникновении, поддержании очагов инфекции и распространении вирусов гриппа А и болезни Ньюкасла.

***Современные подходы создания эффективных безопасных вакцин и стратегии вакцинации против особо опасных инфекций (на примере лихорадки долины Рифт и гриппа птиц подтипа Н5).***

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

***Обоснование выбора штамма вируса лихорадки долины Рифт.***

С целью подбора кандидатного штамма и лабораторной модели для определения полноты инактивации вируса ЛДР, контроля антигенных и

иммуногенных свойств вакцины изучены иммунобиологические свойства штаммов вируса ЛДР, имеющих в коллекции музея микроорганизмов ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Установлено, что наиболее чувствительной моделью, обеспечивающей стабильные результаты, отражающие патогенез и развитие клинических и патологоанатомических изменений при ЛДР, практически идентичные таковым у ягнят до 6 мес. возраста, являются аутбредные белые мыши 1-3-дневного возраста и взрослые особи массой 20-25 г, что позволило использовать их для контроля полноты инактивации вируса и предварительной оценки протективных свойств разрабатываемых вакцин против ЛДР.

Изучение молекулярно-биологических свойств штаммов вируса ЛДР, показало, что аттенуированный штамм «1974-ВНИИВВиМ» - адаптирован к росту в культуре клеток и накапливается с титром инфекционной активности выше  $6,5-7,0 \lg \text{МЛД}_{50/\text{см}^3}$ ; стабилен - отсутствие реверсии вирулентности в течение 10-15 последовательных пассажей в перmissive культуре клеток; безвреден для животных при парентеральном введении; индуцирует синтез специфических антител, что отвечает всем требованиям МЭБ к кандидатам изготовления инактивированной вакцины. Специфичность штамма подтверждена ОТ ПЦР и нуклеотидным секвенированием. При определении нуклеотидной и соответствующей аминокислотной последовательности генов гликопротеинов штаммов «1974-ВНИИВВиМ» и «Энтеббе» определено, что на участке *gn*-гена 410-2020 п.н. у штамма «1974-ВНИИВВиМ» имеется 7 единичных замен, которые не влияют на конформационную структуру эпитопов гликопротеинов, ответственных за синтез вируснейтрализующих антител. На участке *n*-гена штамм «1974-ВНИИВВиМ» имеет уникальную замену в положении 159E→G (глутаминовой кислоты на глицин), что может служить генетическим маркером отечественного аттенуированного штамма вируса ЛДР. Сравнительный рестрикционный анализ консервативных последовательностей *nss*-гена РНК аттенуированных штаммов вируса ЛДР показал, что штамм «1974-ВНИИВВиМ» в изучаемой области генома не имеет сайта рестрикции PaeI, что может также служить генетическим маркером

штамма. В ходе проведения экспериментальных исследований установлено преимущество использования штамма «1974-ВНИИВВиМ» и роллерного метода культивирования, обеспечивающих получение вирусосодержащего сырья с высокой инфекционной ( $8,5-8,9 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50/\text{см}^3}$ ) и антигенной активностью в РНГА - 1:128-1:256, в ТФ ИФА – 1:625-1:3125. Результаты представлены на рисунке 2.

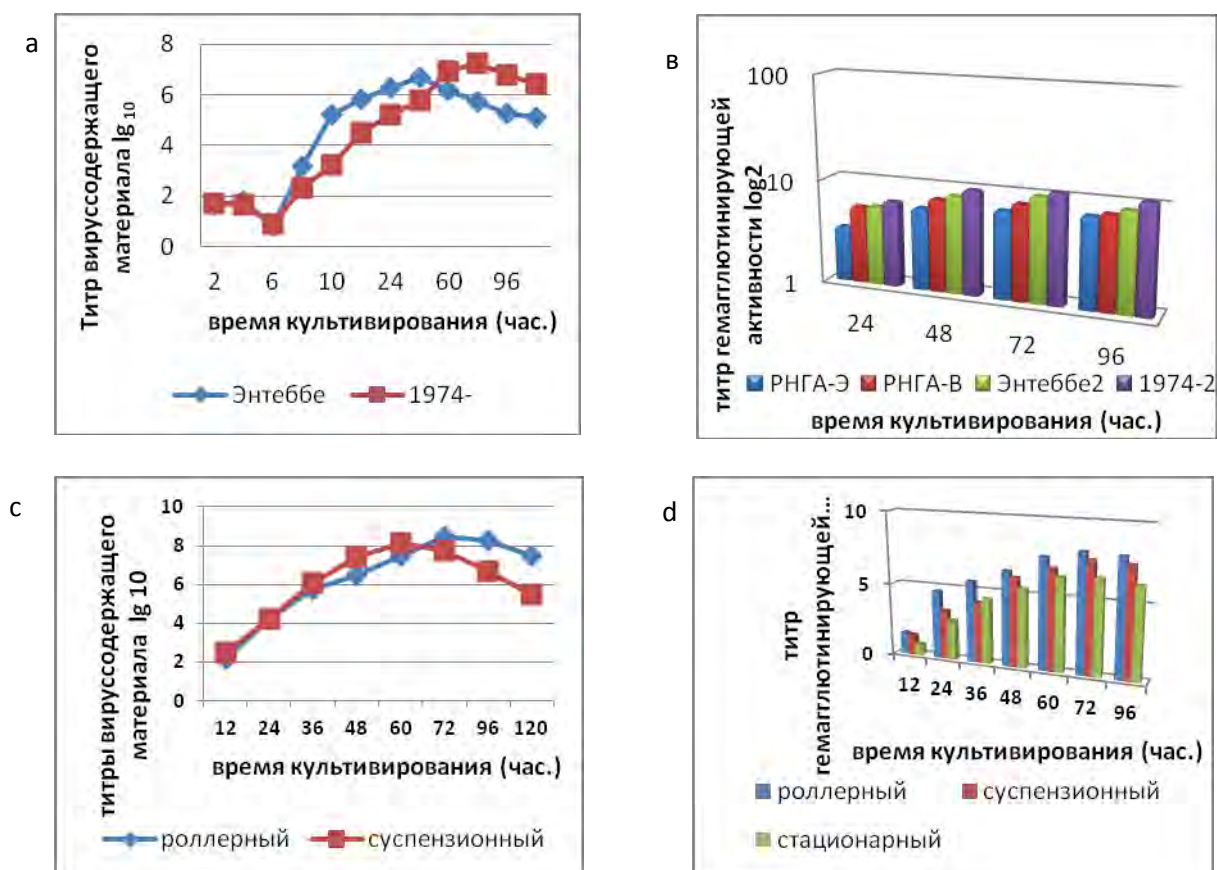


Рис.2 –Инфекционная и антигенная активность вируса лихорадки долины Рифт штамм «1974-ВНИИВВиМ» в культуре клеток ВНК-21/13 при различных методах культивирования. а и в – стационарный метод; Энтеббе 2, 1974-2 – результаты ТФ ИФА; с и d – роллерный и суспензионный.

При изучении устойчивости вируса ЛДР к действию инактиваторов: формалина, теотропина, димераэтиленмина, β-пропиолактонана установлено, что воздействие теотропина (А-24) в конечной концентрации – 0,1%, при температуре 18-22°C, экспозиция 72-96 часов обеспечивает инактивацию инфекционной активности с максимальным сохранением антигенной активности. Сравнительное испытание иммуногенности инактивированного и нативного вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» выявило индукцию синтеза



ВН антител в организме мышей обоими антигенами вируса ЛДР на 14 сутки после прививки в пределах 1:8-1:16 и 1:16-1:32, соответственно.

Установлено, что использование осветленной вирусосодержащей суспензии с концентрацией белка не выше  $0,5 \text{ мг/см}^3$ , контроль полноты инактивации в течение трех последовательных пассажей на мышах 1-3 дневного возраста и в гомологичной культуре клеток гарантировали высокую степень безопасности изготавливаемого инактивированного антигена вируса ЛДР. В результате проведенных исследований определен критерий антигенности и установлена прямая корреляция гемагглютинирующей активности и иммуногенности образцов инактивированного антигена вируса ЛДР ( $r=0,92$  при  $p \leq 0,05$ ). Минимальная иммунизирующая доза препарата, содержащая в  $1 \text{ см}^3$  64 ГАЕ, стимулирует образование ВН антител (1:8-1:16) и обеспечивает 50-60% защиту животных от гибели при заражении летальной дозой вирулентного штамма «Энтеббе». Таким образом, предложенные способы предварительной оценки антигенности, превентивных свойств вакцины на лабораторной модели являются достоверными, безопасными позволяют проводить контроль вакцины на любой стадии производства.

Определена иммуностимулирующая активность адьювантов, повышающая антигенные и иммуногенные свойства препаратов инактивированного антигена. Установлено, что использование ГОА предпочтительней, так как в данном случае наряду с иммуностимулирующим действием происходит одновременное концентрирование антигена и стабилизация препарата.

В ходе проведения исследований по изучению эффективности гомологичной прайм-бустерной иммунизации на основе ГОА-сорбированного инактивированного антигена штамма «1974-ВНИИВВиМ» установлено, что препараты инактивированного антигена вируса ЛДР введенные двукратно с интервалом 14 дней в дозе  $0,5 \text{ см}^3$ , содержащей 256-512 ГАЕ, индуцировали синтез специфических антител, определяемых, начиная с 10 суток, обеспечивали формирование напряженного протективного иммунитета у привитых животных, начиная с 21-28 суток и 82-95% защиту от заражения 1000 ЛД<sub>50</sub> вирулентного штамма «Энтеббе» в течение 60 дней (срок наблюдения)

при 100% гибели контрольных животных в течение первых 3-5 сутки после заражения. Результаты исследований представлены в таблице 4.

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

Таблица 4

Динамика накопления специфических антител в сыворотках крови 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*	
М-д контроля	РН	РЗНГА	ТФ ИФА*	%
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: \* - для ТФ ИФА начальное разведение сыворотки крови мышей 1:50.

*Эффективность гомологичной прайм-бустерной ДНК-иммунизации против гриппа птиц пятого подтипа.* Эффективность применения подхода ДНК-иммунизации показана на примере ДНК-конструкций: pInfNP, pInfNA5, несущих вставку, соответственно, полноразмерного *n*-гена и консервативного участка *ha5*-гена ВГП. Работу проводили совместно с Беловым С.Ю. с соавторами и сотрудниками (исследовательская группа д.х.н. Е.А. Марквичевой) ИБХ РАН (г. Москва).

Установлено, что специфические антитела к ВГП в сыворотках крови цыплят 28-суточного возраста после однократной ДНК-иммунизации

обнаружены, начиная с 7 суток, достигающие максимальных значений к 14-21 суткам; к 28-30 суткам титр антител снижался. После двукратной ДНК-иммунизации с интервалом 14 суток титр ВН антител в сыворотках крови животных находился в пределах 1:4-1:16. Процент защиты животных от контрольного заражения высоковирулентным ВГП штамм А/Курган/2005 H5N1 в дозе 100 ЛД составил 55-60%. Для усиления иммунного ответа и предохранения от воздействия клеточных протеаз рекДНК вводили в составе биodeградируемых микрокапсул, мембраны которых состояли из полиэлектролитов: хитозан/карагинан [(СН-2(mod)/Car)<sub>3</sub>] и декстран/карагинан [(DEAE-dextran/Car)<sub>3</sub>]. Результаты исследований показали преимущество введения рекДНК в составе микрокапсул хитозан/карагинан. Выявлено преобладание в первые 8 дней после ДНК-иммунизации развитие 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. В результате проведенных исследований установлено, что двукратная внутримышечная ДНК-иммунизация инкапсулированной рекДНК рInfNA5 и/или отдельно и в сочетании с рекомбинантной плазмидой рInfNP обеспечивала 65-75% уровень защиты цыплят от летальной дозы 100 ЛД<sub>50/цыпл.</sub> гомологичного штамма H5N1 (А/Новосибирск/05 H5N1), индукцию перекрестного иммунитета в пределах одного подтипа NA5 (А/Пенсильвания/83/H5N2). Одновременно введенные рекомбинантные плазмиды рInfNA5 и рInfNP обеспечивали развитие гетеросубтипического иммунитета и 40% защиту привитых цыплят от гибели при заражении летальной дозой гетерологичного подтипа (А/цыпленок/Росток/29/H7N7). Синтезируемые в результате генетической иммунизации специфические антитела взаимодействовали в РТГА, нТФ ИФА и нейтрализовали в РН антигены ВГП гомологичного пятого подтипа разных субтипов, но не вступали в реакцию и не обеспечивали нейтрализацию вируса подтипа H7.

*Эффективность гомологичной прайм-бустерной ДНК-иммунизации против лихорадки долины Рифт.* Изучена на клинически здоровых аутбредных белых мышцах массой 18-25 г способность ДНК конструкций рСI-neo/Gc3/3 и рСI-

neo/Gn/2/2 (50 мкг/мышь), несущих вставку полноразмерных генов гликопротеинов Gn/Gc вируса ЛДР, индуцировать ранний иммунный ответ, определяемый по уровню продукции специфических антител, наличию мРНК цитокинов, активации и пролиферации Т- и В-лимфоцитов.

В результате проведенных исследований установлено, что гомологичная прайм-бустерная иммунизация вызывала значительное нарастание титра сывороточных антител только после двух бустер-доз ДНК-конструкций рСI-neo/Gc3/3 и рСI-neo/Gn/2/2. Однократная бустер-доза рекДНК с интервалом 14 суток привела к незначительному увеличению уровня специфических антител, который через 14 дней составлял: вирусспецифических- 1:1400-1:1800 и ВН - 1:16-1:32, что превышало в 2,2-2,9 раза уровень антител к 14 дням после однократного введения рекДНК. Среднее значение коэффициента вариации титра антител для каждой группы не превышало 3,8-4,0%, при среднем значении стандартного отклонения  $<0,5\log_2$ . Высокий уровень индукции синтеза специфических АТ, в том числе ВН обеспечивали рекомбинантные плазмиды в сочетании с генетическим адъювантом CpG ОДН, заключенные в полиэлектролитные биосовместимые биodeградируемые микрокапсулы и микрогранулы состава поли-L-лизин/альгинат. Установлено, что в результате трехкратной гомологичной ДНК прайм-бустерной иммунизации происходит нарастание концентрации ВН антител в сыворотке крови привитых животных (титр антител 1:64-128), снижение фонового уровня реакции ТФ ИФА с антигенами гетерологичных вирусов, что свидетельствует об усилении аффинности и авидности синтезируемых антител.

*Эффективность воздействия различных систем доставки иммуногена на развитие иммунитета против лихорадки долины Рифт.* Изучение формирования иммунного ответа при различных системах доставки антигена проводили на пяти группах белых мышей массой 18-25 г, которых иммунизировали внутримышечно: 1 группа - 3-кратно рекомбинантными ДНК<sub>Gn/Gc</sub> (50 мкг/мышь) с CpG ОДН в составе биodeградируемых микрогранул; 2 группа - двукратно инактивированным цельновирioнным сорбированным на

ГОВА антигеном вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» (в дозе  $0,5 \text{ см}^3$  256 ГАЕ); 3 группа - методом гетерогенной прайм-бустерной иммунизации – праймирование рекДНК<sub>Gn/Gc</sub>, бустирование через 14 дней ГОВА-сорбированным инактивированным антигеном вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ»; 4 группа - однократно аттенуированным вирусом ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» в дозе  $10^{4,0}$  ТЦД<sub>50/см3</sub>; 5 группа – контрольная, интактные белые мыши. Полученные результаты, представленные в таблице 3, показывают, что рекДНК со вставкой генов гликопротеинов вируса ЛДР, как и живая вакцина, индуцируют синтез специфических антител, выявляемый на детектируемом уровне к 5-7 суткам, в то время как инактивированная вакцина обеспечивала синтез такого же уровня антител только к 10-14 суткам после введения.

В результате проведенных исследований установлено, что использование генетического адьюванта CpG ОДН и введение рекДНК<sub>Gn/Gc</sub>/CpG в составе биodeградируемых микрогранул состава поли-L-лизин/альгинат обеспечивало усиление иммунного ответа. Гетерологичная прайм-бустерная иммунизация: - бустер-доза ГОВА-сорбированного инактивированного антигена, введенная через 14 суток после праймирования рекДНК<sub>Gn/Gc</sub> с CpG ОДН обеспечивала повышение уровня ВН антител до 1:64-1:128 и титра специфических антител в ТФ ИФА - 1:2048-4096 и обеспечивала защиту более 90% животных от вирулентного штамма к 28-30 суткам после праймирования (срок наблюдения). По сравнению с гуморальным ответом при двукратном введении только ДНК-вакцины или ГОВА-сорбированного инактивированного антигена.

При определении «иммунного статуса» белых мышей, привитых различными прототипами вакцин против ЛДР, установлено, что препараты инактивированного антигена и рекДНК не оказывали иммуносупрессивного воздействия на иммунную систему, в отличие от живой аттенуированной вакцины, которое, при иммунорегуляторном индексе в пределах нормы (2,0-2,5; норма >1), выражалось в снижении относительного и абсолютного количества лимфоцитов –35-40(норма 42,3-48,5), и субпопуляций Т-лимфоцитов - CD3 – 52-54 (60-66,7), CD4 – 34-36 (47-52). Также установлено, что рекДНК, как и живая вакцина стимулируют активацию и пролиферацию CD8+ и CD4+

Т-клеток, подтверждая преобладание клеточного иммунитета в течение 3-7 суток после ДНК-иммунизации и живой вакциной. Этот факт доказывает также состояние цитокинового профиля иммунизированных мышей. В первые 3-7 суток установлено наличие экспрессии мРНК цитокинов ИЛ-2, ИНФ- $\alpha$ , ФНО- $\alpha$ , ИНФ- $\gamma$  и ИЛ-1 $\beta$ , свидетельствующее о функциональной активности иммунитета Th1-типа и преобладающего в группах, иммунизированных рекомбинантными плазмидами и аттенуированным штаммом вируса ЛДР; экспрессию мРНК цитокинов ИФН- $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-18 отмечали в группе 2, привитых инактивированным антигеном; выявление на 7 сутки экспрессии мРНК цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 в группах мышей, иммунизированных аттенуированным штаммом и инактивированным антигеном вируса ЛДР и на 10 сутки – во всех группах, кроме контрольной, свидетельствовало о функциональной активности иммунитета Th2-типа.

Проведенные в данной работе исследования, показали, что метод доставки генетического материала и синтез антигена оказывают определяющее влияние на исход иммунного ответа. ДНК-иммунизация представляет собой безопасную и эффективную стратегию праймирования иммунного ответа на антиген, кодируемый в плазмидном векторе. Объединение традиционной алюминий-сорбированных вакцин с ДНК-вакцинами определяет синергизм двух различных методов доставки иммуногена и обеспечивает развитие раннего иммунитета; может быть основой подходов для иммунизации животных всех возрастных групп и физиологического состояния; использования методов альтернативных вакцинации, осуществления DIVA концепции.

Принимая во внимание реальную угрозу заноса ЛДР на территорию РФ, разработана «Схема обеспечения готовности противодействия в случае угрозы возникновения (заноса) ЛДР». Предложенная система ответных мер направлена против всех звеньев эпизоотической цепи в случае возникновения ЛДР. Применение в угрожаемой зоне для иммунизации восприимчивых животных препаратов, не содержащих реплицирующийся вирус, инактивированного вируса, их комбинацию приведет к разрыву звена, связанного с инфицированием переносчиков, передачей возбудителя. Использование систем прогнозирования возможных вспышек ЛДР, таких как мониторинг избытка

осадков, ГИС-технологий, позволяет заблаговременно (5-6 месяцев) принять контрольные меры, использовать результаты лабораторных исследований по созданию библиотеки генов вируса, эффективных диагностических, вакцинных препаратов для отработки технологических регламентов, определить необходимые объемы и развернуть промышленное производство достаточных количеств реагентов для конструирования тест-систем ранней диагностики и средств иммунизации, обеспечивающих своевременное выявление патогена (24 часа) и раннюю защиту (3-7 суток) восприимчивых животных от заражения вирулентным вирусом.

### **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 инактивированного антигена из аттенуированного штамма, обеспечивающих развитие раннего иммунитета у привитых животных.

2. Антигенные и иммуногенные свойства рекомбинантных белков Gn/Gc, NS 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 гибридной 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 инактивированного очищенного вирусного антигена.

6. На основании результатов изучения молекулярно-биологических свойств штаммов вируса ЛДР, имеющих в коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, для изготовления инактивированных вакцин против ЛДР рекомендован штамм «1974-ВНИИВВиМ», отвечающий требованиям МЭБ. Штамм стабилен, накапливается в чувствительной культуре клеток в пределах  $7,0-7,5 \lg \text{ ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ ; 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 инактивированного 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, заключенных 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.

**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  $\text{рекДНК}_{\text{Gn/Gc}} \rightarrow \text{ГОА-сорбированный инактивированный антиген вируса}$  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 инактивированного антигена вируса. Мероприятия, реализуемые в соответствии с предлагаемой схемой, призваны обеспечить эпизоотическую и в конечном счете биологическую безопасность РФ.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации.**

##### ***Список работ, опубликованных в изданиях, рекомендованных ВАК.***

1. Жиангерова О.В., Капустина О.В., Новиков Б.В. Получение моноклональных антител к поверхностным антигенам вируса гриппа птиц/ О.В. Жиангерова, О.В. Капустина, Б.В. Новиков //Ветеринария. -2009.-№3. - С.53-54
2. Конструирование рекомбинантного продуцента группоспецифического антигена вируса блютанга/ Н.Н. Власова, О.В. Капустина, А.С. Казакова, А.С.Каталымов //Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.- 2009.- №4.-С.52-55

3. Constructing of Blutongue virus group-specific recombinant antigen producer/ N.N. Vlasova, A.S. Katalymov, O.V. Kapustina, Kasakova A.S. Russian Agricultural Sciences [Электронный ресурс]. – 2009.-Vol.35.-№4.-P.273-276.
4. Индикация и дифференциации штаммов вируса ЛДР на основе полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа /Н.Н.Власова, В.И.Балышева, И.Ю. Хухорова, Н.И.Закутский, С.Д.Кушнир, О.В.Капустина, А.Н.Жуков //Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.- 2012, №1.-С. 47-51
5. Identification and Differentiation of Rift Valley Fever Virus Strains by the Polymerase Chain Reaction Method and Restriction Analysis/ N.N.Vlasova, Balysheva V.I., Zakutskii N.I., Kushnir S.D., Kapustina O.V., Zhukov A.N //Russian Agricultural Sciences [Электронный ресурс]. – 2012.-Vol.38.-№1.-P.65-68.- ШифрИнформрегистра: DOI:10.3103/S106836741201020X. – Режим доступа: <http://link.springer.com/article/10,3103/S106836741201020X>.
6. ДНК-вакцины: конструирование защитных препаратов против лихорадки долины Рифт./ Н.Н. Власова, В.И. Балышева, Т.Э. Южук, О.В. Капустина, И.Ю Хухорова //Вестник Ульяновской ГСХА.- 2012, №1 (17). С.54-59
7. Клонирование полноразмерных копий кДНК генов вируса ЛДР/ И.Р.Иматдинов, А.Г.Прилипов, Н.Н.Власова, О.В.Капустина, В.И. Балышева, //Вестник Ульяновской ГСХА.- 2012, №4 (20). С.43-48
8. Моноклональные антитела к структурному белку р30 вируса африканской чумы свиней/ А.С.Першин, А.С.Казакова, Н.Н.Власова, О.В. Капустина //Вестник Ульяновской ГСХА.- 2013.- №2 (22).- С.30-34
9. Генноинженерные конструкции в технологии моноклональных антител/ О.В. Капустина, Н.Н. Власова, В.И. Балышева, А.С. Першин и др.//Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук - 2014. -№1.-С. 46-48
10. Изучение иммунного ответа при иммунизации мышей рекомбинантными плазмидами, включенными в биodeградируемые микрокапсулы. / В.И. Балышева, Иматдинов И.Р., Власова Н.Н., Белов С.Ю., Капустина О.В., Селина О.Е. // Биотехнология. -2013.-№5. С.71-77
11. Некоторые иммунобиологические свойства аттенуированного штамма лихорадки долины Рифт/ В.И. Балышева, Н.И. Закутский, О.В.Капустина, Н.Н. Власова, Е.В.Прудникова //Научный журнал КубГАУ № 73 (09) 2011 <http://e.j.kubagro.ru/2011/09/pdf/27.pdf>.
12. Сравнительное изучение чувствительности и специфичности иммуноферментного анализа с хемилюминисцентной и колориметрической детекцией для выявления антигенов и антител к вирусам гриппа птиц и болезни Ньюкасла/ О.Н.Виткова, О.В. Капустина, Т.П. Лобова, и др.// Вопросы вирусологии. -2015.-№6. С.41-45.

13. Оптимизация культивирования и молекулярно-биологическая характеристика аттенуированного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт/ И.Р. Иматдинов, В.И. Балышева, В.Н. Пономарев, О.В. Капустина // Сельскохозяйственная биология. -2015.-Т.50, №6. С.794-802.

#### *Патенты*

14. Пат. № 2409384 RU МПК А61К39/00(2006.01) Способ получения микрокапсул для доставки ДНК в макроорганизм / Балышева В.И., Марквичева Е.А., Власова Н.Н., Белов С.Ю., Капустина О.В., Селина О.Е.; ГНУ ВНИИВВиМ на изобретение. Заяв. 2009126856 от 15.07.2009, бюл. №21 от 20.01.2011 г.

15. Пат. № 2457255 № 2409384 RU МПК С12Q 1/68 (2006.01) Синтетические олигонуклеотидные праймеры, способ выявления и дифференциации штаммов вируса лихорадки долины Рифт на основе полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа /Власова Н.Н., Хухорова И.Ю., Закутский Н.И., Капустина О.В., Цыбанов С.Ж. // Заяв.2010122054 от 27.07.2012 г.

16. Пат. № 2534343 RU МПК А61К45/00 (2006.01) Способ получения моноклональных антител к белку р30 вируса АЧС с использованием рекомбинантных конструкций /Капустина О.В., Першин А.С., Власова Н.Н., Казакова А.С. //Заяв. № 2013140510 от 2.09.2013. Бюл. № 33 от 27.11.2014 г.

#### *Список работ, опубликованных в других изданиях и материалах конференций.*

17. Изучение некоторых биологических свойств вируса болезни Гамборо/ О.В., Капустина, Соковых Л.И., Симонова Э.Г., Чевелев С.Ф. // Тезисы докладов научной конференции ВНИИВВиМ, посвящ. 70-лет. ВОСР.-1987.- т.3.- С.129-132

18. Капустина О.В., Чевелев С.Ф., Сафонов Г.А. Изучение антигенности и иммуногенности инактивированной вакцины в процессе хранения / О.В.Капустина, С.Ф. Чевелев, Г.А. Сафонов //Тезисы докладов научной конференции ВНИИВВиМ, посвящ. 70-лет. ВОСР.- 1987.- т.4.- С.133-135

19. Капустина О.В., Соковых Л.И., Чевелев С.Ф. Приготовление препаратов для идентификации флебовирусов/ О.В.Капустина, Соковых Л.И., Чевелев С.Ф.//Тезисы докладов научной конференции ВНИИВВиМ, посвящ. 70-лет. ВОСР.- 1988.-С.42-44

20. Капустина О.В., Чевелев С.Ф., Сафонов Г.А. Изучение длительности иммунитета против ЛДР у животных, вакцинированных инактивированной вакциной против ЛДР / О.В. Капустина, С. Чевелев., Г.А. Сафонов //Тезисы докладов научной конференции ВНИИВВиМ, посвящ. 70-лет. ВОСР.- 1988.- С.130-132

21. Научный отчет «Создание ассоциированной инактивированной вакцины против болезни Ньюкасла, ССЯ-76 и ИБК»/ О.В. Капустина, Г.А. Сафонов, О.В.Белун, А.П. Башмакова //Архив ПЗБ.- 1995г.- Инв.№ П-1484
22. Гистологическое исследование головного и спинного мозга диких парнокопытных, обитающих на территории Госкомплеса «Завидово»/ О.В.Капустина, Б.В.Новиков, И.М.Сургучева, В.И.Фертиков, Е.М.Хрипунов//В кн.: Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии с-х животных и людей.- Покров, 2002.- С.45-48
23. Получение МКА к приону КРС/ О.В. Капустина, Б.В. Новиков, И.М.Сургучева, Е.Г Анохина., В.Н.Пономарев //Междунар. конф.- Покров, 2003.- С.309-311.
24. Перспектива создания диагностических наборов нового поколения на основе генно-инженерных технологий / Н.Н., Власова Жигалева О.Н., О.В.Капустина, Новиков Б.В., Цыбанов С.Ж. //Междунар. конф. 21-23.06.2006г., Ульяновск.- С.136-139.
25. Выявление и дифференциация вируса гриппа А подтипов H5 и N1, методом ПЦР/ О.Н.Жигалева, В.Г.Бурдинский, А.А.Орлов, О.В. Капустина //Междунар. конф. 21-23.06.2006г., Ульяновск.- С.106-109.
26. Новые методы диагностики и специфической профилактики ЛДР/ Н.И.Закутский, И.Ю. Хухорова, О.В. Капустина, А.С. Каталымов //Междунар. конф. «Проблемы зооинж. и ветеринарной медицины».- Харьков, 2007г. - вып.15(40).-т.2.-С.365-368.
27. Разработка и внедрение комплексной программы по предупреждению заноса особо опасных болезней птиц в птицеводческих хозяйствах Алтайского края (грипп птиц, б. Ньюкасла, туберкулез, сальмонеллез, орнитоз)/ П.И., Барышников, А.Ю. Бондарев, Н.И.Елистратов, Б.В.Новиков, О.В.Жиангерова, О.В.Капустина //Сборник научных статей по результатам научн-исслед работ, вып 1, «Наука – Алтайскому краю 2006-2007», АлтГТУ.- Барнаул, 2007.-С.185-189.
28. Иммуноферментные методы на основе моноклональных антител для диагностики гриппа птиц / О.В., Капустина, Б.В.Новиков, О.В Жиангерова., А.И.Чурин, Н.А.Власов, О.А. Панова //Российско-Американская конференция по болезням диких животных, 12-15.03.2007, Москва.- С.125-127.
29. Хухорова И.Ю., Закутский Н.И., Капустина О.В. Новые методы диагностики и профилактики ЛДР/ И.Ю.Хухорова, Н.И. Закутский, О.В.Капустина // Животноводство России.- 2007.- №5.- С. 15-20.
30. Новиков Б.В., Жиангерова О.В., Капустина О.В. Выявление гемагглютиниана вируса гриппа птиц подтипа H5 иммуногистохимическим

методом ИФА на основе МКА/ Б.В., Новиков, О.В. Жиангерова, О.В.Капустина /Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: Междунар. научно-прак. конф. -Щелково, 2008.- С.63-67.

31. Выявление специфических антител в сыворотках крови дикой и синантропной птицы/ Б.В.Новиков, О.В. Жиангерова, А.Ю. Бондарев, Н.И. Елистратов, О.В. Капустина / Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными болезнями животных. Труды Междунар. конф., посвященной 50-летию ВНИИВВиМ.-Покров, 2008.- С.114-118

32. Новиков Б.В., Жиангерова О.В., Капустина О.В. Идентификация гемагглютинаина вируса гриппа 5 сероподтипа в перевиваемых культурах клеток с использованием моноклональных антител / Б.В.Новиков, О.В.Жиангерова О.В. Капустина //Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными болезнями животных. Труды Междунар. конф., посвященной 50-летию ВНИИВВиМ.-Покров, 2008.- С.151-153

33. Хухорова И.Ю., Каталымов А.С., Капустина О.В. Лихорадка долины Рифт / И.Ю.Хухорова, А.С.Каталымов, О.В. Капустина // Животноводство России.- 2008.- №2.- С.35-36

34. Получение и оценка специфичности гипериммунных сывороток против поверхностных антигенов спор *V.anthraxis* / И.В.Лягоскин, И.В. Вологина., Ю.О.Селянинов, Б.В. Новиков, О.В. Капустина, Е.И. Барышникова //Межд. научн.–практ. конф. ВИЭВ.- 2009.- С. 442-445.

35. Использование рекомбинантного белка р30 для выявления специфических антител к вирусу африканской чумы свиней/Н.Н.Власова, А.С. Казакова, О.В.Капустина, О.М Стрижакова //Междунар. научно-прак. конф., Ульяновск: ГСХА, 2009.-т.4. С.124-127

36. Получение и изучение иммунологических свойств моноклональных антител к эпитопаамионного белка жвачных животных / И.М., Сургучева, О.В. Капустина, Б.В. Новиков, Е.Г. Анохина, В.Н. Пономарев //Труды Международной конф., посвященной 50-летию ВНИИВВиМ.-Покров, 2008.- С.1514-1519

37. Влияние композиционного состава микрокапсул на индукцию специфических антител/ В.И Балышева., Н.Н. Власова, О.В. Капустина, С. Ю. Белов //Междунар. научно-прак. конф., Ульяновск, 2008.-т.1.-С.117-121.

38. Иммунный ответ на введение рекомбинантных плазмид, содержащих гены вируса гриппа птиц H5, NP и NS1 / Н.Н. Власова, В.И. Балышева, О.В. Капустина С.Ю. Белов // Труды Международной научно- практической конф. - Покров, 2008, Том 1.-С. 101-105

39. Выявление геномов вирусов Найроби и лихорадки долины Рифт методом реал-тайм ПЦР / А.С.Малоголовкин, Н.Г.Сальников, Капустина О.В., С.Ж. Цыбанов, Д.В. Колбасов// Сборник «Молекулярно-генетическая диагностика. - Москва, 2010.-т.2.- С.166-168.
40. Непрямой иммуноферментный анализ для определения антител к антигенам вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / А.С. Першин А.И.Чурин, О.В.Капустина, О.М., Стрижакова, Б.В.Новиков //Материалы Междунар. научн.-практич. конф. ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.- Покров, 2011.- С.112-114
41. Изучение инактивации вируса лихорадки долины Рифт различными инактивантами/ В.И.Балышева, Н.И.Закутский, Т.Э.Южук, О.В.Капустина//Актуальные аспекты интегрированной защиты животных от болезней: сб. научных трудов междунар. науч.-практической конф.- Тюмень, 2011.- С.34-36
42. Effect of microcapsule composition upon specific antibody induction/ В.И. Балышева, С.Ю. Белов, Н.Н. Власова, О.В. Капустина, Е.А.Марквичева, О.Ю. Селина // XVInternational/Workshop on bioencapsulation, Dublin,Ireland,4-6 september.-2008.-P45.-P. 1-4.
43. Получение моноклональных антител к рекомбинантному белку р30 вируса Африканской чумы свиней с использованием метода прайм-бустерной иммунизации /А.С. Першин, А.С.Казакова, Т.Э.Южук, И.В.Лягоскин, Н.Н.Власова, О.В. Капустина ///Мат. конфер. молодых ученых ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. – Покров, 2012.- С. 77-83.
44. Конструирование вектора для экспрессии гликопротеина Gp вируса ЛДР *in vitro*/ И.Р. Иматдинов, Н.Н.Власова, О.В. Капустина, В.И.Балышева //Междунар. научно-практич. конф. Научные основы производства и обеспечения качества биологич. препаратов для АПК.- Щелково, 2012г.- С.119-125.
45. Лихорадка долины Рифт: различные аспекты ДНК вакцинации/ И.Р. Иматдинов, Н.Н.Власова, О.В. Капустина, В.И.Балышева //Междунар. Научно-практич. конф. «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». Ульяновск, 22-24 ноября 2012г.-189-197.
46. Разработка и совершенствование методов диагностики ЛДР / О.В. Капустина, Н.И. Сальников, М.В. Колосова, В.Н. Пономарев, Т.Э. Южук // Всероссийская Научно-практич. конф. с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных».- Ставрополь, 22-24 мая 2012г.- С.171-172.
47. Разработка и совершенствование средств профилактики ЛДР/ О.В. Капустина, В.И.Балышева, Н.И. Закутский, И.Ю. Хухорова //Всероссийская Научно-практич.конф. с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных».- Ставрополь 22-24 мая 2012г.- С.172-173.
48. Лихорадка долины Рифт: угроза и современные пути борьбы/ И.Р.Иматдинов, О.В. Капустина, Н.Н.Власова, В.И. Балышева //Всероссийская Научно-практич. конф.

с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных».- Ставрополь, 22-24 мая -2012г. С.192-193.

49. Антигенная активность культурального штамма «1974 –ВНИИВВИМ» вируса лихорадки долины Рифт/ В.И.Балышева, О.В.Капустина, Н.И.Закутский, Н.Н.Власова //Актуальные вопросы ветеринарной медицины Сибири: материалы Междунар. науч.- практ. конф. -Улан-Удэ - 2013г.- №2.- С.113-115.

50. Балышева В.И. Капустина О.В., Иматдинов И.Р., Лихорадка долины Рифт. Характеристика болезни и принципы конструирования вакцин/ В.И. Балышева, О.В. Капустина, И.Р.Иматдинов, //«Биоиндустрия 2013». Тез.докл. III Междунар. выставки-конф. – СПб., 2013.- С.11-13.

**Благодарности.** Автор благодарит председателя диссертационного совета Академика РАН, д.в.н., профессора Гулюкина М.И. и ученого секретаря д.б.н. Ездакову И.Ю. за представленную возможность проведения защиты в данном диссертационном совете; главных сотрудников ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии д.б.н. Бударкова В.А., д.в.н. Хрипунова Е.М., д.б.н. Юркова С.Г., д.в.н. Балышева В.М. ведущих научных сотрудников д.в.н. Кушнера А.Т., д.б.н. Балышеву В.И. к.б.н. Иматдинова И.Р., сотрудников лабораторий Биотехнологии, Биохимии, Биофизики, Музейных штаммов, Диагностики;д.б.н. Мезенцеву М.В., Руссу Л.И. – руководителя и н. с. лаборатории культур тканей ФГУ«НИИ вирусологии им. Ивановского»; Виткову О.Н. ФГБУ ЦНМВЛ за оказание практической, консультативной помощи в выполнении отдельных этапов работы и обсуждении полученных результатов. Особую признательность и благодарность автор выражает д.б.н., профессору, Члену-Корреспонденту РАН Сафонову Г.А., ведущему научному сотруднику ФГБУ «ВНИИЗЖ» д.б.н. Власовой Н.Н. за поддержку и помощь на всех этапах выполнения работы.

#### **Список используемых сокращений.**

**анти-ГА** – антигенаглотинирующие антитела

**АЧС** – африканская чума свиней

**ВБН, НБ, б. Ньюкасла** – вирус болезни Ньюкасла

**ВГП, ГП** – вирус гриппа птиц,

**ВН** - вируснейтрализующие антитела

**ГАЕ** – гемагглютинирующая единица

**ГОА**–гидроокись алюминия

**ДАС ТФ ИФА**-двухсайтовый сэндвич-вариант ТФ ИФА

**DIVA**-стратегия - дифференциация вакцинированных животных от инфицированных

**IgMKA** – выделенные иммуноглобулины MKA

**ИАЗ** – иммуноасцитическая жидкость

**ИЛ**–интерлейкин

**ИФН- $\alpha$ ,  $\beta$**  – интерфероны  $\alpha$  и  $\beta$

**MKA** – моноклональные антитела

**ОП<sub>405</sub>** – оптическая плотность при длине волны  $\lambda=405$  нм

**ОТ ПЦР** – обратнo транскриптазная полимеразная цепная реакция

**PrP KPC** – прионный белок KPC – крупного рогатого скота

**РНГА** – реакция непрямой гемагглютинации рекДНК – рекомбинантная ДНК со вставкой гена целевого белка

**ССА** - сахарозо-ацетоновый антиген

**СрГОДН**– олигодезоксинуклеотидцитозинфосфат-гуанозин

**Th0/Th1/Th2** –подтипыТ-хелперов

**Теотропин**, 1,8,3,6-диэндометилен-1,3,6,8-тетразацклодекан-теотропина, (А-24)

**ТФ ИФА** – твердофазный иммуноферментный анализ

**ТЦД<sub>50/см3</sub>** – тканевая цитопатическая доза



**ИЦХ** **ИФА**-иммуноцитохимический  
метод иммуноферментного анализа  
**ЛДР** – лихорадка долины Рифт  
**нТФ ИФА** – непрямой ТФ ИФА

**ФНО- $\alpha$** - фактор некроза опухоли- $\alpha$   
**ЭЛД/ЭИД** – эмбриональная летальная  
доза/эмбриональная инфицирующая доза