

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР –
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

на правах рукописи

Селезнева Екатерина Валерьевна

Разработка тест-систем для иммунодиагностики вирусной геморрагической болезни кроликов на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук
Ездакова Ирина Юрьевна и
кандидат биологических наук
Мухин Алексей Николаевич

Москва – 2023

СОДЕРЖАНИЕ:

1	Введение	5
2	Обзор литературы	10
2.1	Вирусная геморрагическая болезнь кроликов	10
2.2	Характеристика возбудителя	11
2.3	Эпизоотологические данные	15
2.4	Патогенез и клинические признаки	19
2.5	Патологоанатомическая картина	20
2.6	Лабораторная диагностика	21
2.7	Иммунитет и специфическая профилактика	23

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3. 1	Материалы и методы	27
3.1.1	Вирусы	28
3.1.2	ПЦР и секвенирование	28
3.1.3	Система бакуловирусной экспрессии генов	28
3.1.4	Культуры клеток и питательные среды	32
3.1.5	Определение концентрации recVP60 в ИФА	32
3.1.6	Электрофорез в ПААГ	33
3.1.7	Иммуноблоттинг	34
3.1.8	Очистка recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2.	35
3.1.9	Определение концентрации общего белка	36
3.1.10	Определение гемагглютинирующей активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	36
3.1.11	Электронная микроскопия	36
3.1.12	Определение антигенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	36

3.1.13	Определение антигенного родства штаммов двух генотипов вируса ГБК и полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	38
3.1.14	Определение иммуногенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	38
3.1.15	Проведение ИФА для выявления специфических антител к вирусу ГБК у кроликов	39
3.1.16	Применение разработанной тест-системы для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу ГБК у кроликов	40
3.1.17	Определение чувствительности и специфичности разработанных тест-систем.	41
3.1.18	Проведение сэндвич-ИФА для выявления вируса ГБК в патологическом материале и recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости	42
3.1.19	Исследование образцов патологического материала полученного от павших и больных животных	43

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1	Нуклеотидная последовательность генома и филогенетический анализ штамма «Тула» вируса ГБК	43
4.2	Определение уровня экспрессии recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	45
4.3	Электрофорез и иммуноблоттинг recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	46
4.4	Электронная микроскопия ВПЧ recVP60	49
4.5	Определение антигенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	49
4.6	Антигенное родство штаммов двух генотипов вируса ГБК и полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2	55
4.7	Определение степени корреляции полученных результатов при постановке ИФА и РТГА	57
4.8	Определение иммуногенной активности recVP60-GI.1, recVP60-	58

	GI.2 в отношении вирусов ГБК 1-го и 2-го генотипов	
4.9	Разработка сэндвич-ИФА (АГ-ВГБК) на основе recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 для выявления антител к вирусу ГБК	61
4.10	Определение чувствительности и специфичности разработанного сэндвич-ИФА на основе recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 для выявления антител к вирусу ГБК	65
4.11	Разработка сэндвич-ИФА (АГ-ВГБК) для выявления recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости и вирусного АГ геморрагической болезни кроликов генотипов GI.1 и GI.2 в патологическом материале	70
5.	ОБСУЖДЕНИЕ	75
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
7.	ВЫВОДЫ	85
8.	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	86
9.	РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	86
10.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	87
11	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	89
12.	ПРИЛОЖЕНИЯ	113

1. Введение.

Актуальность темы.

В настоящее время в Российской Федерации и во всем мире наблюдается рост интереса к кролиководству. Происходит увеличение поголовья кроликов, содержащихся как в индивидуальных хозяйствах, так и в условиях промышленных кролиководческих комплексов.

Наибольший экономический ущерб, наносимый отрасли, связан с инфекционной патологией и в первую очередь с вирусной геморрагической болезнью кроликов (другие названия "некротический гепатит" или "геморрагическая пневмония" кроликов) — это высококонтагиозное, остропротекающее заболевание, которое характеризуется проявлениями геморрагического диатеза во всех органах, но преимущественно данные изменения наблюдаются в печени и легких [17, 19]. Вирус поражает помимо домашних кроликов, также и популяции зайцев, тем самым идет влияние на зависимых от них хищников [82, 83, 61].

Возбудителем вирусной геморрагической болезни кроликов (ВГБК) является лаговирус относящийся к роду *Lagovirus* семейства *Caliciviridae*. Вирус впервые был обнаружен в 1984 в Китае и выйдя за его границы в 1986 году, распространился по всему миру, в том числе и был идентифицирован в России [20]. Смертность при инфицировании вирусом ГБК 1-генотипа составляет 80%. В 2010 во Франции был выявлен новый вирус ГБК 2-го генотипа, вспышки которого возникали в том числе и в тех хозяйствах, где животные были вакцинированы от ВГБК 1-го генотипа [113]. Смертность при инфицировании вирусом ГБК 2-го генотипа составляет 20%. На территории РФ его фиксировали в Тверской и Московской областях в 2018 г., а также в Нижегородской области и Красноярском крае в 2019 г. [11], но биологические свойства его недостаточно изучены.

Геном возбудителя ВГБК представляет собой одну молекулу одноцепочечной «+» РНК, длиной 7437 нуклеотидов, состоящей из двух слегка перекрывающихся открытых рамок считывания (ORF): ORF1, содержащий нуклеотиды с 10 по 7044, и ORF2, содержащий нуклеотиды с 7025 по 7378 [138]. ORF1 кодирует неструктурные белки и основной капсидный белок VP60 [23, 60, 196], который отвечает за гемагглютинирующую активность, биологические и иммунологические свойства вируса ГБК, в том числе и за выработку протективных антител, ORF2 кодирует минорный структурный белок VP10 [196].

Основным методом, применяемым в России для выявления вирусного антигена в диагностических целях, является реакция гемагглютинации (РГА). РГА является трудоемким методом с невысокой чувствительностью и специфичностью, кроме того, требуется идентификация обнаруженного гемагглютинирующего агента в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со специфическими сыворотками к вирусу ГБК, которая сама по себе часто дает ложноположительные результаты.

Для проведения молекулярной диагностики ВГБК применяют различные варианты ПЦР.

Определение уровня специфических к вирусу ГБК антител проводят в РТГА, которая также является низкоспецифичной и сложновыполнимой реакцией.

Проблема изготовления диагностических и профилактических препаратов связана с отсутствием репликации лаговирuсов в культурах клеток. Соответственно АГ для всех тест-систем и профилактических препаратов является печень инфицированных кроликов, что в свою очередь связано с необходимостью соблюдения строгих мер биобезопасности и биоэтики при ее изготовлении.

Тест-системы для диагностики ВГБК, произведенные в России, отсутствуют, а иностранные коммерческие наборы для определения вируса ГБК и

антител к нему являются труднодоступными. Поэтому важно разработать высокоспецифичные, чувствительные и доступные методы, такие как ИФА, для лабораторной диагностики ВГБК.

Степень разработанности темы исследования.

До проводимых исследований было известно, что полученные в бакуловиральной системе экспрессии рекомбинантные белки (recVP60), способны самособираются в вирусоподобные частицы (ВПЧ), у которых в составе не содержится нуклеиновая кислота, поэтому они не способны инфицировать клетки человека и животных, что обеспечивает их безопасность [6]. Авторами Johnson, J. E et al., 2000; Mateu, M. G 2013; Metz, S. W et al., 2011; Van Oers, M. M et al., 2015 было установлено, что бакуловиральная система экспрессии является лучшей для получения рекомбинантных белков с целью получения ВПЧ. Было показано, что ВПЧ обладают биологическими свойствами, характерными для вирусных частиц [178] и индуцируют полную защиту кроликов от заболевания [56].

Наличие антигенных свойств у recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 [74] открывает дальнейшие перспективы использования их в качестве компонентов вакцин для специфической профилактики и диагностических систем, направленных на выявление у кроликов антител к вирусу ГБК. На их основе возможна разработка сэндвич-иммуноферментного анализа (ИФА) и их можно использовать в качестве АГ в РТГА.

На момент начала исследований в России не существовало тест-систем для иммунодиагностики ВГБК GI.1 и GI.2 генотипов на основе рекомбинантных главных белков и профилактических препаратов на их основе.

В результате работы были разработаны тест-системы на основе рекомбинантных главных капсидных белков VP60 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 для обнаружения вируса ГБК и специфических антител к нему.

Цель работы.

Разработать тест-системы для выявления вируса ГБК и специфических антител к данному вирусному антигену на основе рекомбинантных главных капсидных белков VP60 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2.

Задачи исследования.

1. Определить полную нуклеотидную последовательность и провести филогенетический анализ генома штамма «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа.
2. Разработать технологию получения рекомбинантных главных капсидных белков VP60 (resVP60) вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в бакуловирусной системе экспрессии генов и охарактеризовать полученные продукты.
3. Изучить антигенные и иммуногенные свойства полученных resVP60 для кроликов.
4. Разработать тест-систему (АТ-ВГБК) на основе resVP60 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в формате непрямого ИФА для обнаружения антител к вирусу ГБК.
5. Оценить возможность применения разработанной тест-системы (АТ-ВГБК) для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу ГБК у кроликов.
6. Разработать тест-систему (АГ-ВГБК) в формате сэндвич-ИФА для выявления антигена вируса ГБК на основе использования моноклональных антител к основному капсидному белку VP60 вируса ГБК.
7. Оценить возможность применения разработанной тест-системы (АГ-ГБК) для выявления вируса ГБК в патологическом материале и для определения концентрации resVP60 в образцах культуральной жидкости в процессе получения resVP60.

Научная новизна работы.

Определена полная нуклеотидная последовательность и проведен филогенетический анализ генома штамма «Тула» вируса ГБК генотипа GI.2.

Впервые в РФ в бакуловирусной системе экспрессии генов получены рекомбинантные главные капсидные белки VP60 вируса ГБК 1-го и 2-го генотипов и изучены их биологические свойства.

Теоретическая и практическая значимость исследований.

Определена полная нуклеотидная последовательность генома и проведен филогенетический анализ штамма «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа.

Разработана технология получения в бакуловирусной системе экспрессии гесVP60 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 и изучены их биологические свойства.

Разработан СТО 00496165-0002-2021 Набор для иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу геморрагической болезни кроликов в сыворотке крови.

Разработаны Методические указания МУК Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в патологическом материале методом сэндвич-ИФА ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Методология и методы исследования.

Для выполнения работы была изучена и проанализирована научная литература, использованы молекулярно-биологические, биотехнологические, серологические методы исследования, проведена статистическая обработка полученных результатов.

Предметом научного исследования в данной работе являлось получение и характеристика рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК и их дальнейшее использование для разработки тест-систем ИФА. Объектами исследований являлись естественно восприимчивые животные - кролики. Все опыты проводились согласно Конвенции «О защите позвоночных животных,

используемых для экспериментов или в иных научных целях» и «Российскому законодательству о защите лабораторных животных».

Личный вклад соискателя.

Диссертационное исследование выполнено при непосредственном участии автора. Участие соавторов отражено в совместно опубликованных научных работах.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Результаты данной научной работы докладывались на научно-производственных совещаниях ООО «Ветбиохим» и АНО «НИИ ДПБ» (г. Москва, 2019-2023 гг.) и на межлабораторном совещании сотрудников ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (г. Москва, 2023 г.). Значимый раздел данной работы, в котором описана корреляция реакции гемагглютинации и сэндвич-ИФА доложен на V международной конференции AGRITECH V-2021.

2. Обзор литературы

2.1 Вирусная геморрагическая болезнь кроликов

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) - высоко контагиозное заболевание диких и домашних кроликов, вызываемое лаговирუსами. ВГБК считается самым распространенным в мире инфекционным заболеванием кроликов и наносит значительный экономический ущерб [61, 143, 198]. На сегодняшний день, кролиководство является перспективным направлением животноводства - ежегодно около 2 миллионов кроликов забиваются исключительно на мясо, также большое количество кроликов используется в качестве лабораторных животных [23, 66, 122, 153, 154], поэтому при возникновении ВГБК идет влияние на экономику и научные исследования, а при возникновении ВГБК, вызванной вирусом 2-го генотипа среди диких зайцев идет влияние на зависимых от них хищников.

Происхождение вируса ГБК недостаточно изучено. Одной из теорий является происхождение от непатогенной формы вируса [94] или слабопатогенных вирусов кроликов, которые регистрировались в Европе, Америке и Австралии [34, 42, 111, 179].

Филогенетический анализ и анализ на выявление рекомбинации показали, что первые штаммы GI.2, считавшиеся ранее не рекомбинантными, появились в результате рекомбинации между GI.3 и GI.2. Причем вирусы геногрупп GI.3 так же были основным донором для неструктурной части, а GI.2 - для структурной части, и все описанные на данный момент штаммы GI.2 являются продуктом рекомбинации [21].

Вирус ГБК 2-го генотипа, в отличие от «классического» вируса ГБК, обладает более низкой вирулентностью, вызывает менее яркие клинические признаки, болезнь чаще протекает в хронической и подострой формах, инфицируются животные моложе 4-х недельного возраста. Вирус 2-го генотипа вызывает в среднем смертность только 20% экспериментально инфицированных кроликов, что неизменно меньше, чем при инфицировании вирусом ГБК 1-го генотипа и инфицирует различные виды зайцев [169].

2.2 Характеристика возбудителя

ВГБК вызывается лаговирusernameми относящимися к роду *Lagovirus* семейства *Caliciviridae*.

В данное время выделяют 4 геногруппы лаговирusernameсов у кроликов, две патогенные: GI.1 (GI.1a- GI.1d) и GI.2, и две не патогенные: GI.3 и GI.4 [114]. Среди патогенных вирусов ГБК отмечают: «классический» с геногруппами GI.1 – GI.5 [146], подтип вируса ГБКa, относящийся к геногруппе GI.6 [102], и вирус ГБК 2-го генотипа (GI.2), впервые идентифицированный в 2010 году во Франции [109]. Калицивирусы зайцев относятся к геногруппам GI.1- GI.5 [114].

Вирулентность патогенных лаговирusernameсов, варьируется от низкой до

высокой с летальностью до 100% [41, 42, 106, 109].

Таблица 1.

Патогенные и непатогенных лаговирuсы кроликов и зайцев

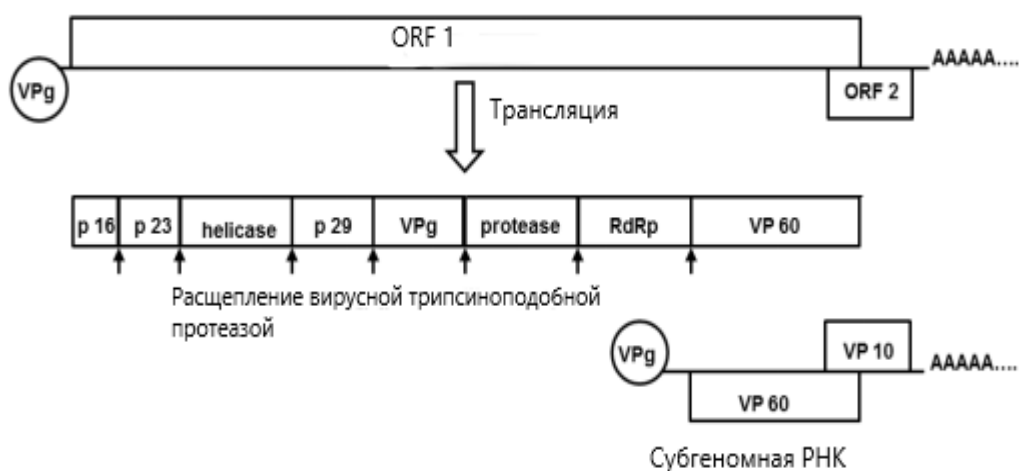
Название вирусoв (заболевание)	Генотип
Вирус ГБК-1 («классический»), патогенные	GI.1 (GI.1b, GI.1c, GI.1d)
Подтип вирус ГБКа, патогенные	GI.1a
Вирус ГБК-2, патогенные	GI.2
Калицивирусы кроликов, непатогенные	GI.3, GI.4
Синдрoм зайца-русака, патогенные	GI.1
Калицивирусы зайцев, непатогенные	GI.2, GI.3*, GI.4*, GI.5*

* Предварительные обозначения для трех недавно описанных калицивирусов зайцев в Австралии [114].

Геном возбудителя ВГБК представляет собой одну молекулу одноцепочечной «+» РНК [138, 147, 155, 158], которая содержит две открытые рамки считывания (ORFs), ORF1 кодирует неструктурные белки и основной капсидный белок VP60 [23, 61, 107, 139, 196], ORF2 кодирует минорный структурный белок VP10 [196].

Рисунок 1.

Геномная организация вируса ГБК [21].

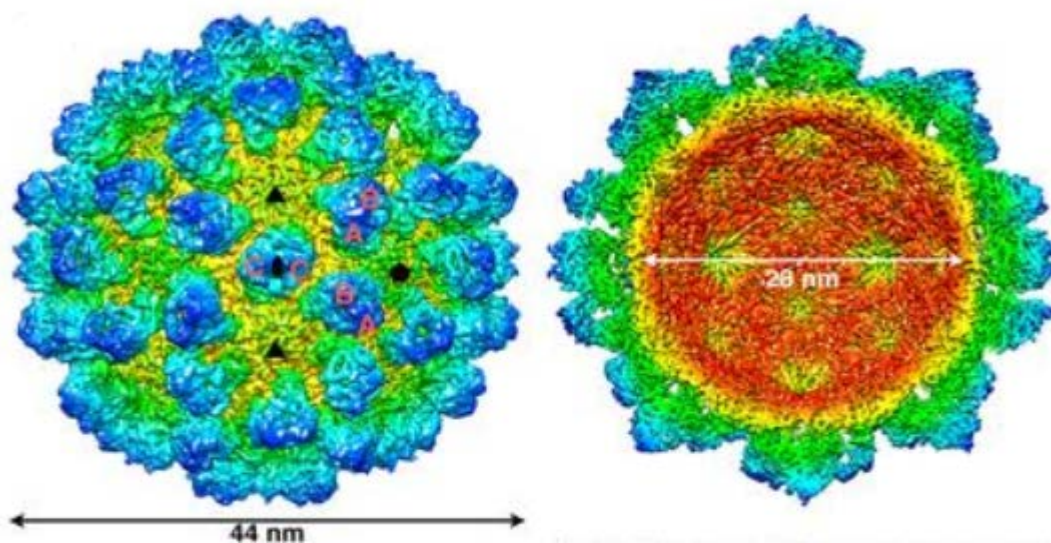


Как и у других калицивирусов, вирионы вируса ГБК имеют небольшие размеры (35-40 Нм в диаметре) и не имеют оболочки.

Капсид вируса, обладающий икосаэдрическим типом симметрии $T = 3$, состоит из 90 дугообразных димеров капсидного белка, которые образуют 32 чашеобразных углубления [81, 183, 188].

Рисунок 2.

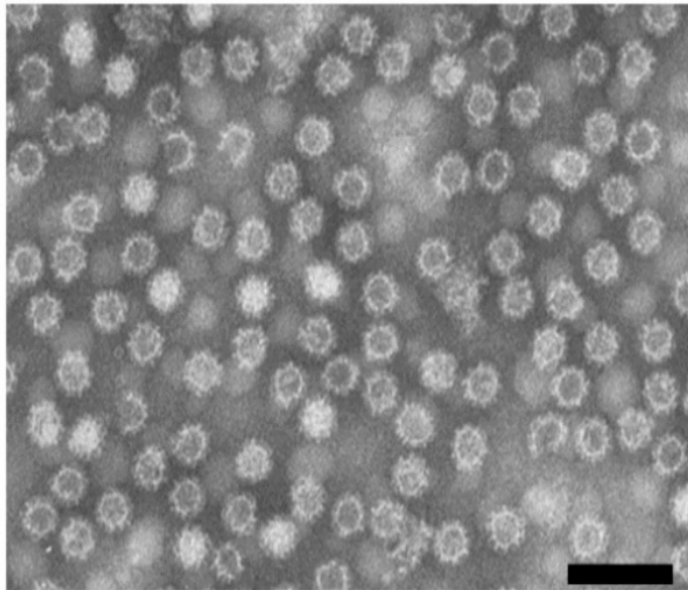
Вирион вируса ГБК с цветовой маркировкой по радиусу [193].



Икосаэдрические 2-, 3- и 5-кратные оси обозначены черными символами, а капсомеры АВ и СС идентифицированы. Справа показано внутреннее строение вируса ГБК [193]

Рисунок 3.

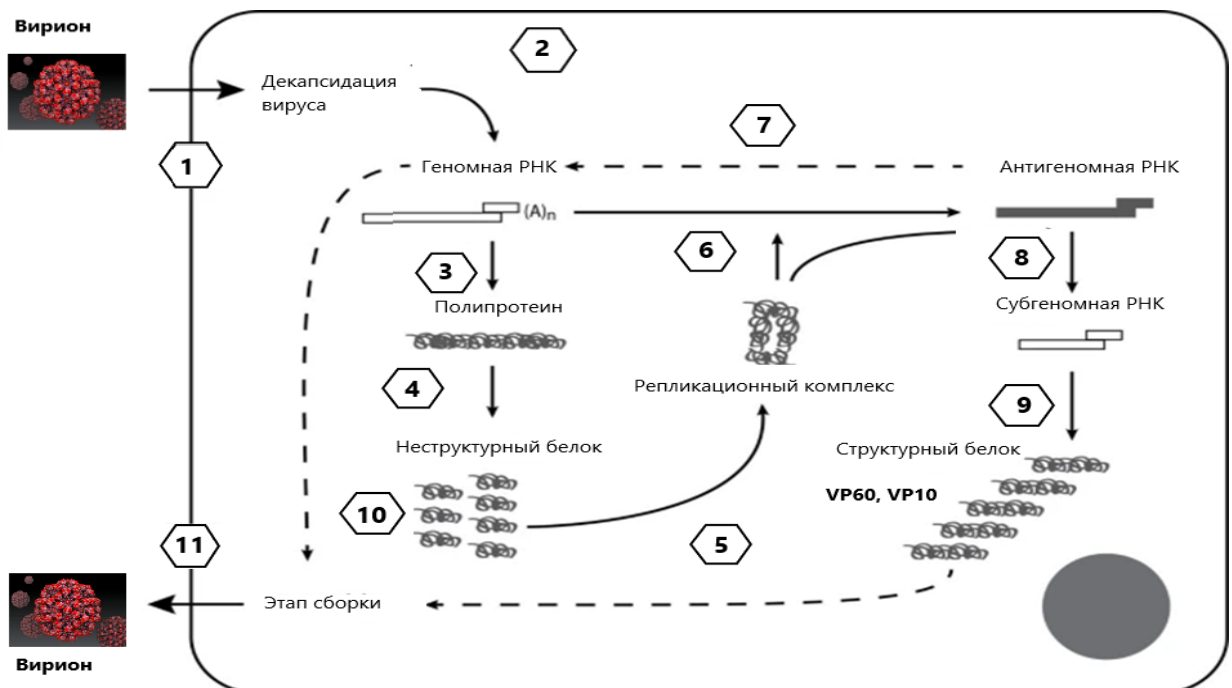
Электронная микроскопия вирионов вируса ГБК (GI.1), выделенных из печени инфицированного кролика [23].



Цикл репликации калицивирусов представлен на рисунке 4.

Рисунок 4.

Цикл репликации калицивирусов [23].



После присоединения к клеточному рецептору вирион проникает в клетку методом эндоцитоза (этап 1). За первым этапом «раздевания» вируса и высвобождения генома (этап 2) следует трансляция предшественника полипротеина (этап 3) и посттрансляционная обработка, которая высвобождает неструктурные белки (этап 4). Эти белки формируют комплекс репликации (этап 5), который синтезирует антигеномную РНК (этап 6), которая сама используется в качестве шаблона для синтеза геномной РНК (этап 7). Синтезированная геномная РНК используется как предшественник полипротеина (этап 3) или включается в состав вириона при сборке вирусных частиц (этап 10). Антигеномная РНК также является матрицей для синтеза субгеномной РНК (этап 8). С субгеномной РНК транслируются структурные белки VP60 и VP10 (этап 9). У лаговирuсов VP60 также высвобождается из предшественника полипротеина после обработки вирусной протеазой. Высвобождение зрелого вириона из клетки (шаг 11) следует за сборкой структурных белков и упаковкой геномной РНК (шаг 10) [23].

Вирус ГБК устойчив к нагреванию до 50° С в течение 60 минут и циклам замораживания-оттаивания. Чувствителен к хлорсодержащим дезинфектантам и щелочам (NaOH 1%, формалин 1-2%) и не чувствителен к действию растворителей липидов, сохраняет свою инфекционную и гемагглютинирующую активность при показателях рН от 3 до 9. Термостабильность вируса ГБК снижается в средах, которые обогащены одновалентными ионами. Раствор β-пропиолактона с концентрацией 0,2–0,5% при 4°С инактивирует вирус при сохранении его иммуногенной активности. Длительное хранение при низких температурах в жидкой среде или при лиофильном высушивании, вирус может утратить гемагглютинирующую активность, сохранив при этом инфекционность [2, 7].

2.3 Эпизоотологические данные

Вирус ГБК впервые был идентифицирован в Китае в 1984 году во время вспышки заболевания, от которого в течение 9 месяцев погибло несколько

миллионов кроликов [119, 199]. После первой вспышки вирус быстро распространился в Европе и затем в Африке, обеим Америкам, Азии и Австралии [23].

Впервые в России вирус ГБК был зафиксирован в 1986 году. Начиная с 1987 года, вирус регистрировали в Белоруссии, Украине, Латвии, Молдове, Казахстане, Узбекистане и Туркменистане. В 2006 году вирус ГБК был отмечен в Белгородской, а в начале 2010 года в Курской и Саратовской областях.

В 2010 году во Франции был выявлен новый вариант вируса ГБК, отличавшийся от проявления «классической» болезни, вызванной вирусом ГБК 1-го генотипа, который впоследствии быстро распространился по всей Европе. Вирус, вызывавший новый вариант заболевания, был идентифицирован во время вспышки на промышленной кролиководческой ферме в Италии в июне 2011 года и отнесен позднее к вирусам ГБК 2-го генотипа.

В РФ вспышки ВГБК, вызванные вирусами 2-го генотипа, были зафиксированы в 2014 году в Челябинской области, в 2018 г. - Тверской и Московской областях, а также в Нижегородской области, Тульской области, Красноярском крае в 2019 г [11, 12].

Вирус ГБК-2-го генотипа заражает не только европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*), как GI.1, но и несколько видов зайцев, включая итальянских зайцев (*Lepus corsicanus*), сардинских капских зайцев (*Lepus capensis mediterraneus*) и европейских бурых зайцев (*Lepus europaeus*) [39, 40, 85, 169].

Вирус ГБК-2 быстро распространился по другим европейским странам. [63] и почти заменил «классический» вариант, таким образом, идет вытеснение вируса ГБК 1-го генотипа вирусом ГБК 2-го генотипа [121, 128].

Вирус ГБК 1-го и 2-го генотипов получил повсеместное распространение по всему миру, причем, его распространение от Европы до географически изолированных мест, таких как Канада, Бенин, Канарские

острова, Азорские острова и Австралия произошло за короткий временной промежуток [22, 27, 30, 110, 194].

Такое быстрое распространение связано с его персистенцией в популяции диких кроликов, недостаточной эффективностью существующих вакцин и высокой устойчивостью вируса к условиям окружающей среды.

Вирус ГБК чрезвычайно контагиозен. Для борьбы с кроликами в Австралии, где они являются основными вредителями и угрозой дикой природе [53, 64, 79, 114], в 1991 году использовался штамм вируса ГБК 1-го генотипа V351 и к 1995 году, вирус, несмотря на принятые карантинные меры, распространился на всю Южную Австралию в течение двух лет и вызвал сокращение популяций кроликов на 95% [65, 99, 100].

В Новой Зеландии наблюдалась примерно такая же ситуация, где вирус ГБК 1-го генотипа, сходный со штаммом V351 был незаконно использован и вызвал аналогичные последствия для популяции кроликов [182].

Репликации лаговирuсов не отмечалось у других млекопитающих (лисы, кошки, хорьки, ежи), птиц (ястребы, чайки), в том числе у хищников, нападающих на кроликов, однако, у этих животных может происходить сероконверсия, хотя и в низких титрах [75, 87, 157].

Введение тканевых суспензий от инфицированных вирусом ГБК кроликов 28 видам позвоночных животных, кроме кроликов, не вызывало репликации вируса – РНК вируса не была обнаружена при исследовании методом ПЦР. Но в 2011 году РНК вируса ГБК была обнаружена у грызунов, что дает возможность предполагать участие других видов в распространении инфекции [136].

Молодые кролики устойчивы к инфицированию вирусом ГБК 1-го генотипа [141], степень устойчивости зависит от уровня материнских антител [170], может снижаться при иммуносупрессии [127] и коррелирует с врожденными иммунными реакциями, особенно с теми, которые связаны с комплексом гистосовместимости II, естественными клетками-киллерами,

макрофагами и холангиоцитами [126, 151]. Врожденной устойчивости к заболеванию способствует наличие материнских антител к непатогенным калицивирусам кроликов, которые индуцируют частичную перекрестную защиту от вирулентных вариантов [43, 55, 72, 73, 116, 180]. Материнские антитела передаются трансплацентарно в последние дни беременности. Крольчата могут приобрести антитела с молозивом, но этот путь в формировании иммунитета играет лишь незначительную роль. Материнские антитела у крольчат относятся исключительно к типу IgG и сохраняются у некоторых крольчат до 12-недельного возраста (обычно не дольше 8 недель). Несмотря на устойчивость, молодые кролики, инфицированные вирусом ГБК 1-го генотипа, могут быть долгосрочными носителями инфекционного агента и, таким образом, являются источником передачи вируса [68].

Передача вируса происходит путем прямого контакта с инфицированными животными через оральный, назальный или конъюнктивальный пути.

В полевых условиях инфицированные туши кроликов являются основным резервуаром распространения вируса, так как вирус устойчив к воздействию факторов окружающей среды и вирусные частицы могут сохраняться на срок до трех месяцев [86, 134].

Также вирус передается через загрязненную подстилку, корма и воду, через насекомых (комары, мухи), грызунов [29, 133].

В экспериментальных условиях кролики инфицируются оральным, назальным, подкожным, внутримышечным или внутривенным методами. Для инфицирования кролика конъюнктивальным путем потребуется всего несколько вирионов. Хотя репликация вируса, по-видимому, не происходит у хищников или падальщиков, эти животные (собаки, лисы и т. д.) могут выделять вирус ГБК во внешнюю среду с фекалиями после поедания инфицированных кроликов. Существует версия передачи вируса при участии морских птиц, особенно на прибрежных островах [48].

Распространенность вируса зависит от сезона, циклов размножения и

географического положения, часто идет смена периода с высокой заболеваемостью и летальностью на период с низким уровнем заболеваемости [148]. Основными факторами распространения и передачи вируса являются наличие материнских антител и резистентность молодых кроликов, но иммунитет не сохраняется у следующих поколений, поэтому остается вероятность вспышек в популяции [54, 126].

2.4 Патогенез и клинические признаки

Инфицирование происходит через слизистые оболочки верхних дыхательных и пищеварительных путей. Органом-мишенью при инфицировании вирусом ГБК 1-го генотипа является печень, где вирус, размножаясь в гепатоцитах, вызывает их некроз и апоптоз. Антигены вируса ГБК можно обнаружить в течение первых часов в печени, при этом репликация вируса происходит в цитоплазме гепатоцитов, расположенных в centroacinарных областях [78, 167]. При этом выведение вируса, происходит чрезвычайно быстро и на 4-е сутки вирусные антигены не обнаруживаются в организме животного [175]. Кроме того, у молодых кроликов не во всех гепатоцитах происходит репликация вируса, это указывает на то, что в печени должны произойти структурные и функциональные изменения для поддержки репликации вируса ГБК [145].

Количественные клеточные изменения сопровождаются повышением уровня воспалительных цитокинов. Вирус ГБК индуцирует патологию в лейкоцитах, ведет к истощению В- и Т-лимфоцитов в печени и селезенке, которое приводит к нарушению иммунного ответа. Увеличивается количество макрофагов, и они проявляют выраженную цитопатическую активность.

Исследования методом ОТ-ПЦР показали, что РНК вируса ГБК у крольчат присутствовала уже на 1 день инфицирования в печени [96, 169], желчи и селезенке, а в легких, почках, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах и фекалиях со 2-х суток с момента заражения.

У кроликов наблюдается резкое снижение аппетита и активности, фиксируется повышение температуры, брадикардия, аритмии, шумы в сердце, одышка, выделение из носовых ходов, обезвоживание и в последствие развивается желтуха. Также при острой форме фиксируют проявление неврологических симптомов, чаще это паралич, атаксия и возбуждение [37, 90, 123, 185]. В предсмертной стадии появляются пенистые и кровянистые выделения из носа, кровоизлияния в глазах и носовое кровотечение. При подострой форме симптомы проявляются так же, как и в острой, но более сглажены и носят не столь сильное проявление. Хроническая форма встречается крайне редко и при такой форме идет развитие генерализованной желтухи и анорексии

При заболевании, вызванном вирусом ГБК 2-го генотипа, наблюдаются аналогичные симптомы, как и при заболевании, вызванном вирусом ГБК-1-го генотипа, но носят более длительный характер.

Вирус ГБК-1-го генотипа может вызвать смертельный исход на 2-3 сутки большинства инфицированного поголовья кроликов (летальность от 80 до 90%) и всего у 5-10% животных развивается подострое или хроническое заболевание, сопровождающееся потерей веса, желтухой и смертью в течение 1-2 недель после появления клинических признаков.

2.5 Патологоанатомическая картина

Патологоанатомическая картина при ВГБК характеризуется поражением легких и печени [50, 59, 63, 69, 70, 96]. У инфицированных животных наблюдается некротический гепатит [123, 143, 181], при котором видны многоочаговые поражения гепатоцитов [28, 77, 93, 123, 125, 156, 166, 172].

Печень желтовато-коричневого цвета, имеет выраженный дольчатый рисунок, с кровоизлияниями под капсулой и дряблой консистенции. Легкие отечны, слизистая оболочка трахеи гиперемирована. В тимусе, лимфатических узлах и миндалинах были замечены анатомо-патологические поражения [23, 37, 166].

Селезенка увеличена, в ней, а также в легких, почках, сердце, а также центральной нервной системе наблюдается системный геморрагический диатез с диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС) который вместе с поражением печени [143] являются основными причинами гибели кроликов.

2.6 Лабораторная диагностика

Предварительный диагноз ставится на основе эпизоотологических данных, клинических проявлений заболевания и патологоанатомических изменений, затем проводят лабораторные исследования, которые включают в себя обнаружение и идентификацию вирусного антигена или его РНК.

Возбудителя заболевания можно обнаружить в печени, селезенке и крови. Печень павших животных содержит максимальное количество вируса, однако у кроликов с хроническим или подострым заболеванием, вирус ГБК можно обнаружить в селезенке легче, чем в печени.

Реакция гемагглютинации (РГА) с эритроцитами человека I группы - являлась первым тестом, который использовался для лабораторной диагностики ВГБК [119]. В качестве исследуемого материала в РГА используется 10% гомогенат печени или селезенки. Это достаточно простой в постановке метод, но имеет ряд существенных недостатков: низкую чувствительность и специфичность по сравнению с ИФА и ПЦР, необходимость идентификации гемагглютинирующего агента в РТГА. РГА может дать ложноположительные результаты при содержании в образцах других микроорганизмов, например, пастерелл и парвовируса, а частые ложноотрицательные результаты связаны с низкой концентрацией вируса, наличие деградированных вирусных частиц в результате неправильной обработки и хранения образцов для исследования, а также при хроническом течении заболевания, у кроликов, которые умирают от четырех до семи дней после заражения [44] и при инфицировании штаммами вирусов ГБК, которые не обладают гемагглютинационной активностью [37, 44, 49, 95, 102, 168, 184].

Вирусные гемагглютинины в РГА обнаруживаются в печени уже через 2 ч после инфицирования животного, и достигают максимального значения перед гибелью животного [25]. Гемагглютинины в низких, почти нулевых, титрах регистрируются в сердце, легких, почках, лимфатических узлах, мышцах и головном мозге [115, 192, 197].

Для выявления РНК лаговирюсов применяют ПЦР, в том числе и ПЦР в реальном времени. Вирусную РНК можно обнаружить в легких, почках, костном мозге [146], а также в сыворотке крови, моче и фекалиях [76, 152].

Для ПЦР могут быть использованы разные наборы праймеров, некоторые из которых позволяют идентифицировать вирусы ГБК одновременно двух генотипов. ПЦР обладает высокой чувствительностью (>10⁵ раз чувствительнее чем ИФА), удобна в использовании, позволяет быстро получить результаты. ПЦР в реальном времени, позволяет провести количественную оценку вирусной нагрузки (в 1 мл 10% гомогенате печени может содержаться от 10⁶ до 10⁹ копий генома) [63, 76].

Для идентификации вариантов лаговирюсов используется секвенирование [21].

Наиболее перспективным методом лабораторной диагностики ВГБК является иммуноферментный анализ (ИФА), который служит для выявления антигена вируса и определения уровня антител к нему [135]. ИФА высоко специфичный и чувствительный метод [44, 49]. Конкурентный метод ИФА применялся несколькими группами исследователей, работающими над изучением вируса ГБК [41, 43, 51, 54, 88, 99, 105, 164], которые подтвердили его высокую значимость в диагностике данного заболевания.

Для обнаружения АГ вируса методом ИФА используется гомогенат печени больных кроликов. ИФА на основе моноклональных антител (МкА) к VP60, который является главным капсидным белком вируса ГБК, позволяет проводить типирование изолятов вируса [9, 10].

Для выявления вирусных частиц в патматериале может применяться электронная микроскопия [84].

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА), наряду с идентификацией гемагглютинирующего антигена, выявленного в РГА, зарекомендовала себя, как удобный метод, позволяющий провести титрование специфических антител, возникающих у кроликов в результате естественной инфекции или иммунизации. Антитела могут быть обнаружены экспериментально через 4–6 дней после заражения.

Для выявления специфических АТ к главному капсидному белку (VP60) вируса ГБК, используют «непрямой» и «конкурентный» варианты ИФА.

«Конкурентный» ИФА широко применяется при исследованиях уровня поствакцинальных антител у кроликов и коллективного иммунитета на кролиководческих фермах, поскольку гуморальный ответ играет важную роль в защите животных от ВГБК [42, 44, 108, 171, 200].

«Непрямой» ИФА, при котором вирусные или рекомбинантные АГ вируса ГБК сорбируется непосредственно на иммунологический планшет, является хорошим инструментом для изучения перекрестных взаимодействий антител к различным лаговirusам.

Оба варианта ИФА превосходят по чувствительности и простоте постановки РТГА и особенно актуальны при исследовании большого количества образцов.

2.7 Иммуниет и специфическая профилактика

Кролики до 4-недельного возраста устойчивы к заражению вирусом ГБК 1-го генотипа, тогда как до 90% взрослых особей вирус убивает в течение первых 3 дней после инфицирования. Естественная резистентность молодых кроликов к инфекции ГБК связана с быстрой и эффективной воспалительной реакцией в печени, при которой инфицируется мало гепатоцитов, а также с повышением уровня местных и системных В- и Т-клеток [97, 126].

У кроликов, переболевших подострой формой ВГБК, вырабатываются антитела, которые обеспечивают защиту при повторном заражении [160]. Животные при хронической форме заболевания, как правило, умирают через 1-2 недели [104], но если они выживают, то демонстрируют мощную сероконверсию [44].

Одной из особенностей является длительное наличие материнских антител к вирусу ГБК-2 у крольчат (до возраста от 28 - 58 дней), в отличие от носительства антител к вирусу ГБК 1-го генотипа [31].

В течение 2 недель от момента инфицирования у кроликов титры IgM быстро достигают максимума, а затем резко снижаются. Титры IgA медленно увеличиваются, а уровень IgG нарастает и сохраняется в течение нескольких месяцев. Наличие IgG у молодых кроликов, полученные от матери через плаценту в последние дни беременности, свидетельствует об устойчивости к вирусу ГБК [54], затем идет их снижение с возрастом [52] и кролики становятся подвержены инфицированию. Кроме того, если кролики были инфицированы в раннем возрасте, то в дальнейшем они будут устойчивыми к заражению вирусом ГБК во взрослом возрасте, это доказывает, что их иммунная система может распознавать вирус и вырабатывать эффективный иммунный ответ [71], следовательно, гуморальный иммунитет обеспечивает защиту от ВГБК [103, 158].

Вакцинация является основным методом борьбы с ВГБК [24, 26, 32, 149].

Одной из главной особенностью вируса ГБК 2-го генотипа является его способность преодолевать иммунитет к штаммам вируса ГБК 1-го генотипа, включая его вакцинные штаммы [112].

Вирус ГБК 2-го генотипа способен приводить к летальному исходу кроликов, вакцинированных против ВГБК-1 [58], однако животные, иммунизированные вакцинами против ВГБК-1, частично защищены от ВГБК-2 [58, 108, 110, 186]. По данным Le Gall с соавт., в хозяйствах, где не

проводилась иммунизация вакцинами от ВГБК-1, смертность от ВГБК-2 составляла до 80%, а в хозяйствах, где вакцинировавших животных проводилась, смертность не превышала 25% [161]. После вакцинации от ВГБК-1, уровень перекрестной защиты от инфицирования вирусом ГБК 2-го генотипа – слабый и не защищает от развития инфекции или потерь от заболевания. В связи с чем, вакцины должны включать оба варианта антигенов [113].

На момент проведения данной научной работы, есть доступные коммерческие варианты вакцин от ВГБК. Чаще всего они представляют собой тканевые инактивированные вакцины, которые изготовлены из суспензии печени кроликов, которые были инфицированы вирулентными штаммами вируса ГБК, так как вирус ГБК не культивируется на культуре клеток. Изготовление данных вакцин является дорогостоящим и трудоемким процессом, так как связано с неукоснительным соблюдением правил биологической безопасности при применении вирулентных штаммов вируса на кроликах.

Тканевые инактивированные вакцины против ВГБК были разработаны в начале 1990-х годов, улучшив ситуацию с заболеваемостью на кроличьих фермах [144, 177] и в Российской Федерации был разработан Национальный Стандарт РФ ГОСТ Р 55765-2013 для вакцин применяемых против вирусной геморрагической болезни кроликов тканевых инактивированных.

На момент проведения исследований, была коммерчески доступна «Вакцина против вирусной геморрагической болезни кроликов тканевая инактивированная гидроокисьалюминиевая», но сертификат на вакцину закончился в январе 2021 года. Эта вакцина предназначена для профилактики ВГБК, вызванной вирусом ГБК 1-го и 2-го генотипов. Изготовлена из инактивированной суспензии печени кроликов, которые были инфицированы вирусом ГБК, с добавлением геля гидрата окиси алюминия в качестве адьюванта.

Доступными тканевыми вакцинами против ВГБК являются: Cyлар «Zoetis» Австралия и Lapinject «Ceva Animal Health Ltd» Великобритания, которые применяются для профилактики ВГБК-1, Filavac VHD К С+V «Ceva Animal Health» Великобритания, активна против вирусов ГБК 1-го и 2-го генотипов и Eгавас «Hirra» Испания, которая активна против вируса ГБК 2-го генотипа.

Наиболее перспективными препаратами для специфической профилактики ВГБК являются генноинженерные вакцины.

Разработаны **векторные вакцины** на основе рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего капсидный белок вируса ГБК (VP60), который является протективным [193]. В 2012 году на рынке появилась двухвалентная вакцина против миксоматоза и ВГБК Nobivac Мухо-RHD «Intervet International B.V» Нидерланды, содержащая рекомбинантный вирус миксоматоза кроликов с геном капсида вируса ГБК. В 2020 году появилась вакцина Nobivac Мухо-RHD PLUS «MSD Animal Health» Нидерланды, которая изготовлена из двух рекомбинантных вирусов миксоматоза, каждый из которых содержит ген капсидного белка вирусов ГБК 1-го или 2-го генотипа.

В последние десятилетия наблюдается широкое использование различных систем экспрессии для получения рекомбинантных белков [89, 159, 187]. Полученные белки способны формировать защитные иммунные реакции без риска возникновения заболевания [16] вызванного вакциной.

Для экспрессии белков используются следующие системы: *Escherichia coli* [36], клетки растений [45, 67, 80, 129], личинки насекомых [163] с использованием рекомбинантного бакуловируса [84, 103, 124, 130, 150, 165].

Использование клеток насекомых рекомбинантов бакуловирусов позволяет получать высокое относительное содержание белка VP60, которое можно применять для профилактики ВГБК и при исследовании уровня антител методом ИФА. Рекомбинантные VP60 образуют вирусоподобные частицы.

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) — это супрамолекулярные сборки,

которые похожи на структуру нативных вирионов, но не являются инфекционными, так как не содержат вирусного генома. Они состоят из нескольких копий одного или нескольких вирусных белков и, обычно, антигенно неотличимы от инфекционного вируса или субвирусных частиц, поэтому считаются безопасными и эффективными кандидатами на применение в вакцинах, которые вызывают высокий гуморальный и клеточный иммунный ответ [47, 62, 162, 173, 191, 195].

Благодаря сложной структуре и высокому количеству копий антигена, ВПЧ легко распознаются иммунной системой и являются лучшим кандидатом для вакцинации [118], стимулируя клеточный и антительный иммунитет. Они индуцируют мощный иммунный ответ, благодаря В-клеткам и индуцируют высокоэффективные пролиферативные реакции CD4⁺ Т-клеток и цитотоксический ответ Т-лимфоцитов [101, 173, 195].

ВПЧ легко распознаются антигенпрезентирующими клетками [57], ВПЧ высоко иммуногенны и применение их в качестве вакцин без использования адьюванта также эффективно [33, 120]. Вакцины на основе ВПЧ высоко эффективны для людей и животных. Для их использования требуются высокие производственные затраты, поэтому, чтобы такие вакцины были коммерчески выгодны, должна быть высокая производительность, также ВПЧ использованы для разработки чувствительных и надежных тестов для обнаружения антител к вирусу ГБК [117, 150].

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3. 1 Материалы и методы

Исследования проводились с 2019 г. до 2023 года на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Основываясь на научных данных, изложенных в обзоре литературы, был

разработан план и определены объекты изучения. В работе использовались естественно-восприимчивые животные – кролики (N=100) патологический материал (N=30) и сыворотки от кроликов (N=140). Основными объектами изучения являлись полученные recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2.

Исследования методом ПЦР, проведение электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинг выполняли совместно с сотрудниками лаборатории биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, а также сотрудниками ООО «Ветбиохим».

3.1.1 Вирусы

Источниками вирусов ГБК геногрупп GI.1 и GI.2 служили гомогенаты печени кроликов, инфицированных штаммами «Воронежский-87» и «Тула», с активностью в РГА 1:2048 (10^4 ЛД₅₀/см³).

3.1.2. ПЦР и секвенирование

Наличие РНК вируса ГБК в 10% суспензии печени кролика определяли методом обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием пары праймеров: 5'-саа сgt get сса gtt ttg gta cg-3', 5'-att ctg tct ggt tgg ggc gtg t-3' [5, 14] после выделения с помощью «Набора для выделения РНК» (ООО Ветбиохим, Россия).

Наработанные фрагменты выделяли из геля путем применения набора реагентов «Cleanup Mini» (Евроген, Россия).

Секвенирование производили на геномном анализаторе AB3130 (Applied Biosystems, США) при помощи тех же праймеров.

Анализ полученных последовательностей и построение филогенетических дендрограмм проводили при помощи программ Lasergene 11.1.0. и MEGA 7.0.18 (США).

3.1.3. Система бакуловирусной экспрессии генов

Систему бакуловирусной экспрессии Bac-to-Bac (Invitrogen, США), применяли согласно инструкции производителя совместно с научными со-

трудниками ООО ВЕТБИОХИМ. На первом этапе амплифицированные с вирусных РНК штаммов вирусов геморрагической болезни кроликов «Воронежский-87» (генотип GI.1) и «Тула» (генотип GI.2) гены VP60, фланкированные последовательностями узнавания эндонуклеаз рестрикции, клонировали методом рестрикции-лигирования в трансферный вектор pFastBacHT [1].

Векторы семейства pFastBac несут в своем составе фрагмент, который фланкирован последовательностями бактериального транспозона Tn7. Этот фрагмент содержит полилинкер для клонирования гена, экспрессии которого требуется добиться в бакуловирусной системе, а также ген устойчивости к антибиотику гентамицину, который позволяет осуществлять избирательную селекцию рекомбинантной конструкции. Для получения рекомбинантного бакуловирусного генома на основе трансферных векторов pFastBac с клонированными генами используются клетки *Escherichia coli* DH10Bac. В этих клетках геном бакуловируса ядерного полиэдроза калифорнийской совки присутствует в виде большой бактериальной плазмиды, он замкнут в кольцо, снабжен участком старта репликации (*ori*), устойчивостью к антибиотику тетрациклину. Кроме того, в геном добавлен лактозный оперон, в который встроены фланкирующие последовательности транспозона Tn7. Так же клетки DH10Bac содержат плазмиду-помощник с геном транспозазы, способной к сайт-специфическому переносу фрагментов ДНК, фланкированных последовательностями Tn7. Плазмида-помощник поддерживается в клетках за счет устойчивости к антибиотику канамицину.

Векторы pFastBacHT-vp60-GI.1 и pFastBacHT-vp60-GI.2, несущие вставки рекомбинантной ДНК вирусов ВГБК первого и второго генотипов, были использованы для трансформации химически компетентных клеток DH10Bac. В результате в части трансформированных клеток фермент транспозаза осуществляла сайт-специфический перенос фрагмента трансферного вектора с геном vp60 и геном устойчивости к гентамицину из плазмиды

в бакуловирусный геном по фланкирующим последовательностям транспозона Tn7. При этом нарушается экспрессия лактозного оперона, рекомбинантные колонии не окрашены на среде с X-Gal и IPTG, в то время как колонии, в которых рекомбинация ДНК не прошла, имеют ярко выраженное синее окрашивание. Отобранные белые колонии проверяют методом ПЦР на наличие вставки с олигонуклеотидными зондами, один из которых специфичен к вставке, а другой к модифицированному бакуловирусному геному. Положительные в ПЦР клоны дополнительно проверяют методом определения первичной нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК, кодирующего ген *vr60*, при подтверждении идентичности вставки клон DN10Bac используют для выделения рекомбинантной бакуловирусной ДНК для трансфекции клеток насекомых.

Рекомбинантные ДНК Бак-VP60 выделяли и очищали методом щелочного лизиса. Трансфекцию культуры клеток насекомых Sf-9 выполняли химическим методом с применением катионных липосомных частиц «CellFectin» (Invitrogen, США). Культуру клеток инкубировали 96 часов при 27°C (рекомбинантные бакуловирусы AcORF- GI.1 и AcORF- GI.2 пассаж «0»), а затем снова инфицировали культуру клеток насекомых Sf-9. На 4-е сутки в культуре клеток появлялись признаки ЦПД, клетки увеличивались в размере и погибали. При гибели более 30% клеток, инкубацию прекращали, а полученный после осветления (10 мин., 3000 об./мин.) супернатант использовали как матричную расплодку рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-GI1 и AcORF-1-GI2.

Нуклеотидная последовательность ORF-1 штамма «Воронежский-87»:

```
atggagggcaaaagcccgtgcagcgccgcaaggcgaaacagcgggcactgccaccacagcatcagttcccgaaccacgactgatggc
atggatcctggcgttggccactaccagcgtgatcactgcagaaaattcatccgcatcgattgcaacagcagggattggcggaccaccc
caacaggtggaccaacaagagacatggagaacaattttattacaatgatgtttcacttggtcagtcgaggaccccctggcagcata
cttacaccgtccaacattctccacaacaaccattcacagccgtgctgagccagatgtacgtggctgggctggatgcagtttc
gctcatagttgccgggtcaggtgtgttggggcgactggctcggctgtgataccaccaggcatcgagattggaccaggggttgaggt
caggcagtttctcatgtgtcatcgacgccgttactcgaacctgttaccatcaccatgccagacttgcgtccaacatgtaccatcaa
```

ctggtgaccctggccttgttccacactagtcttagtgtttacaacaaccttatcaaccgtttgggggtccaccagtgaatccagggtg
acagtggaaacaaggccaagtgaagactttgagttcgtgatgattcgagccccctccagcaagactgttgactcaatttccccgca
ggcctctcacaaccccagtccttactgggggttgcaatgacaacagggtggaacggccaatagtgggactgaaccagtacctggagg
gttttctacgtgcaacaggcattggaacttgaatggcagcacataggtcgtgcaagccctcggttggcagattgaccatcgaagaggc
agtgaagttacctgggaacaacgcaaccaactgctccagtttggtagccaatgctgggtctgcaatcgacaacccatttcccag
gttgaccagacggcttctgacatgctgttcgtgcccttaacggccccggcattccagctcggggtgggtcggatttgggtcaatctg
gaacagtaacagcgggtgcccccaacgttacgactgtgcaggcctatgagttaggtttggcactggggcaccaggcaacctccagccac
caccaacacttcagggtgcacagactgtcgcaagtccatttatgccgtgggtgactggcacagccaaaacccagccggattgtttgat
ggcctcggtattatctccaccccaaatgccagcgccatcacatacgcctcaaccagacagaattgtaaccacccggcactcctgc
cgctgcacctgtgggtaagaacacacccatcatgttcgctgctgctcaggcgcaccggtagctcaacgccacagctgggtcagcc
aacgggaccagtagggcacaggctccaaccactgccagtgacaattggactttcgtcaacaactactcgtcagcacttatgccgga
cagttttcgttggcagttaaccttgcacatggtttcatggagataggtttaagtgtagcgggtattttatgcaggaacaggagcctca
accacactcattgacctgactgaactcattgacgtacgcctgtgggaccaggccgtccaaaagcacactcgtgttcaacctggggggc
acagccaatggcttttctatgtctga [13]

Нуклеотидная последовательность ORF-1 штамма «Тула»:

ggcaagcccgtgctggcggcggcaaggcgagacagcgggactgctaccacagcatcggtccctggaaccacaaccgacggcatg
gacctggtgttgggcactactagtggtcaccaccgagaacgcgtccacgtcgattgcaacggcggggattggcgggtccaccccaacaagt
gaccaacaagaactggaggacaactttactacaatgatgttttacatggcagttgcagacgccccgggaacatcctgtacactgtccaaca
ctcgccacaaaacaaccggtttacagctgttctaagtcaaatgtacgctggctgggcccgggtggcatgcaattccggtttatagctgctgggtcaggtg
cttcggtgggctgctggtgacggttataaccaccggcattgagattggccgggggtggaagtcagacaattccccatgttgcattgacgcacg
ttcactcgaaccagtcaccatcaccatgccggactgctcctaacatgtaccaccgacaggcaaccctggcctcgttctacgttggtcctgagcg
ttataacaacctcatcaatccatttgggtgacccagtgatccaggtcacgggtggaacaaggcccagtgaggactttgatttggatgatcc
gtgccccctccagtaagaccgtgactcgtatcgcggcagatctcctcacaaccccggtcctcactgggggttggtaccgacaacagatggaatgg
tgagatagttgggctgcagccagtcccccgggtgggtttctacgtgcaacagacactggaactaaatggtagcacattggatggcaagcccgggt
ttgccgccattgaccacgacagaggtaacgcaagttccctggaagcagttcgtcaaatgtgcttgagctttggatgctagtgcgggtctcggctg
acaactctatctccaaatcgtccagatggttccctgacatgcatttgaccttcagcggcgccaccatccctaccgagggtgggtcgggttcgg
tgggatctggaacagcaataatggtccccctcgttacgactgtgcaggcttatgagttgggctttggcactggagcaccgagcaacctcaacct
ccaccaccacttcaggggctcagattgttccaagtcctctatggcgttgcaaatggcataaaccagacaacagccgggtgtttgtgatggcatcg
gggtgcatatccaccccaaacagtagtgccattacgtacacacctcagccaaacaggattgtcaatgcacctggcaccctgctgctcctattgg
caagaacacaccatcatgttcgctctgtttagggcaccggcgacatcaacgctgaggccgggtcaactaacggaaccagtagcggcggg
gatcacaaccactgcccgtgacagttggaacttcaactaacaattactcatcggcacttatgctgggcaattcttggcagctgaactcgttccg
gctcatggaacttgcttgagttgatggatacttctatgcggggacaggggctcagccaccctcattgacctgagaactgttgacatccgcct
gtgggaccagaccgtccacaagcagcgtgtgtacaactggggggcacaactaatggcttttctatgtctga [13]

Определение наличия нуклеотидных последовательностей ORF-1 ви-
руса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 проводили посредством амплификации
участка нуклеотидной последовательности, включающей фрагмент генома ви-
руса ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographa californica*

(AcNPV) и части экспрессионной кассеты с геном ORF-1 вируса ГБК генотипов GI.1 или GI.2. Индикацию продуктов осуществляли методом электрофореза в агарозном геле.

Титрование полученных рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-GI.1 и AcORF-1-GI.2 проводили методом «бляшкообразования», согласно инструкции производителя системы «Вас-to-Вас» (Invitrogen, США). Титр вирусов выражали в БОЕ₅₀/см³.

3.1.4 Культуры клеток и питательные среды

Для химической трансфекции и получения рекомбинантных бакуловирусов использовали культуру клеток насекомых Sf-9, а для получения recVP60-GI1 и recVP60-GI2 культуру клеток насекомых Hi-5. Клетки выращивали на среде «EX-Cell 420» (Sigma-Aldrich, США) в роллерных установках (10-20 оборотов в минуту при температуре 27°C). Посевная концентрация клеток составляла $3-5 \cdot 10^5$ клеток/см³. Концентрацию клеток и их жизнеспособность определяли в камере Горяева, применяя окрашивание 0,1% раствором трипанового синего [1].

3.1.5 Определение концентрации recVP60 в ИФА

Относительное содержание recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в лизате клеток насекомых Hi-5 определяли путем проведения ИФА с помощью тест-системы INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 («Ingenaza», Испания).

Суспензию культуры клеток насекомых Hi-5, инфицированную рекомбинантным бакуловирусом, с выраженными признаками цитопатического действия, центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин (4°C). Затем проводили ресуспендирование осадка в лизирующем буфере (ФБР, содержащий 0,001 М фенилметилсульфонилфторида и 1% NP-40) в пропорции 3 мл буфера на 10 млрд. клеток и несколько раз подвергали замораживанию – оттаиванию [1]. После ультразвуковой дезинтеграции (5 циклов по 2 мин) центрифугировали 10 мин 10000 об/мин и образовавшийся осадок удаляли. Полученный супернатант исследовали в ИФА. В качестве отрицательного контроля

служил аналогично подготовленный лизат культуры клеток Hi-5, инфицированный AcNPV без вставки.

3.1.6 Электрофорез в ПААГ

Оценку продуктов экспрессии рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-GI.1 и AcORF-1-GI.2 проводили методом электрофореза белков в ПААГ по методу Laemmli на приборе «Mini-PROTEAN II» (Bio-Rad, США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 V.

Состав разделяющего геля:

Акриламид - 12%;

N,N-метилен-бис-акриламид - 0,5%;

трис-НСl pH 8,8 - 0,375 M;

ДСН - 0,1%

ТЕМЕД - 0,075%.

персульфата аммония – 0,025%;

Состав концентрирующего геля:

N,N-метилен-бис-акриламид - 10%;

Акриламид - 4%;

трис-НСl pH 6,8 - 0,125 M;

ТЕМЕД - 0,075%.

персульфата аммония – 0,025%;

Состав электродного буфера pH 8,3:

глицина - 0,192 M;

трис-НСl - 0,025 M;

ДСН - 0,1%.

Состав буфера для образцов рН 6,8:

глицерин - 40%;

в-меркаптоэтанол - 20%;

трис-НСl - 0,25 М;

ДСН - 8%.

Во все испытываемые пробы добавляли краситель «coomassie blue R250» до концентрации 0,3% и прогревали 5 минут при 100°C.

При проведении электрофореза в ПААГ использовали белки-маркеры молекулярной массы PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США).

3.1.7 Иммуноблоттинг

После электрофоретического разделения recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 переносили на мембрану «Immobilon-NC» («Millipore», США) на приборе Multiphor II (ЛКВ, Швеция) (200 мА, 60 минут) [1].

Состав буфера для переноса (рН 8,35):

трис-НСl - 0,025 М;

глицин - 0,193 М;

метанол - 20%.

После переноса, мембраны инкубировали в течение 12 часов при +4°C в 3% растворе Gelatine Blocking Grade (Gerbu, ФРГ) на ФСБТ и следующим этапом отмывали 4 раза в ФСБТ.

Приготовление буферного раствора ФСБТ, рН 7,4–7,6:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 3,28 г

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,133 г

NaCl	8,78 г
Твин 20	1,0 мл
Деионизированная вода	до 1000 мл

Затем 4 раза отмывали в ФСБ.

Приготовление буферного раствора ФСБ, pH 7,4–7,6:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	3,28 г
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,133 г
NaCl	8,78 г
5% $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$	0,5мл/л
Деионизированная вода	до 1000 мл

Окрашивали МАТ к структурному белку капсида вируса ГБК мечеными пероксидазой хрена (АНО «НИИДПБ», Россия) в 3% растворе Gelatine Blocking Grade на ФСБТ (в разведении 1:100). В качестве субстратного раствора использовали 0,05% раствор 3,3'-диаминобензидин (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ и 0,01% H_2O_2 . Окрашивание останавливали промыванием мембран в дистиллированной воде [1].

3.1.8 Очистка recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

Для очистки recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 применяли метод афинной хроматографии на смоле HIS-SelectR HF Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, США) в денатурирующих условиях с использованием 8М мочевины, согласно рекомендациям производителя. Полученные препараты подвергали диализу против 0,15 М ФБР.

Приготовление фосфатно-буферного раствора, ФБР 7,3-7,5

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	3,28 г
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,133 г

5% $C_9H_9HgNaO_2S$ 0,5мл/л

Деионизированная вода до 1000 мл

3.1.9 Определение концентрации общего белка

В полученных очищенных препаратах проводили количественное определение общего белка при помощи набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scinetific, США), согласно инструкции производителя.

3.1.10 Определение гемагглютинирующей активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

РГА проводили микрометодом на полистироловых планшетах с U-образным дном по общепринятой методике с применением 0,75% суспензии эритроцитов человека I группы. В качестве K⁺ (положительного контроля) использовали 10%-ную суспензию печени кролика, инфицированного штаммом вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87», и 10%-ную суспензию печени кролика, зараженного штаммом вируса ГБК 2-го генотипа «Тула». В качестве K⁻ (отрицательного контроля) использовали 10%-ную суспензию печени от заведомо здорового кролика и приготовленный лизат культуры клеток Ni-5, инфицированной AcNPV без вставки. За титр принимали максимальное разведение АГ, дающее гемагглютинацию [13].

3.1.11 Электронная микроскопия

Электронная микроскопия очищенных препаратов recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 методом негативного контрастирования проводилось в АНО «НИИИДПБ».

3.1.12 Определение антигенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

Исследование антигенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 проводили на клинически здоровых кроликах 1,5-3-месячного возраста.

Для оценки антигенной активности использовали выявление у вакцинированных животных специфических антител к вирусу ГБК в ИФА и РТГА.

Для проведения исследования использовали четыре группы животных по 10 кроликов, которые были одинакового веса, возраста, породы и содержались в одинаковых условиях. Первой группе животных вводили гесVP60-GI.1 50 мкг в/м, второй группе - гесVP60-GI.2 50 мкг в/м, следующей группе - гесVP60-GI.1 25 мкг объединив с гесVP60-GI.2 25 мкг в/м, последняя группа была контрольной, животных этой группы не вакцинировали. Испытания начинали проводить не ранее чем через 7 дней после доставки кроликов, чтобы убедиться, что животные были здоровы и хорошо перенесли транспортировку. Все животные были клинически обследованы.

Через 21 сутки производили взятие крови, полученные сыворотки использовали для постановки в РТГА и ИФА INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1 («Ingenaza», Испания). В РТГА каждую сыворотку исследовали с разными вариантами рабочего вируса: гесVP60-GI.1, гесVP60-GI.2, вирус ГБК 1-го генотипа шт. «Воронежский-87» и вирус ГБК 2-го генотипа шт. «Тула».

РТГА проводили микрометодом на полистироловых планшетах с U-образным дном по общепринятой методике с применением эритроцитов человека I группы. В качестве положительного контроля (K+) использовали 10%-ную суспензию печени кролика, зараженного штаммом вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87», 10%-ную суспензию печени кролика зараженного штаммом вируса ГБК 2-го генотипа «Тула», гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2, в качестве отрицательного контроля (K-) использовали 10%-ную суспензию печени от заведомо здорового кролика. За титр сыворотки принимали её наибольшее разведение, которое тормозит гемагглютинацию [13].

Все сыворотки исследовали до и после иммунизации.

3.1.13 Определение антигенного родства штаммов двух генотипов вируса ГБК и полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

Проведя постановку РТГА с перекрестной постановкой сывороток с гомологичными и гетерологичными антигенами, эти данные мы использовали для определения антигенного родства, которое рассчитывается по формуле Архетти и Хорсфала $R\% = 100 \times \sqrt{r_1 \times r_2}$, где

$$r_1 = \frac{\text{титр сыворотки 1 с антигеном вируса 2}}{\text{титр сыворотки 1 с антигеном вируса 1}} \quad r_2 = \frac{\text{титр сыворотки 2 с антигеном вируса 1}}{\text{титр сыворотки 2 с антигеном вируса 2}}$$

Зная титр исследуемых сывороток, который перевели в \log_2 и подставляя в формулу, мы получили результаты, которые интерпретировали согласно J. Brooksby [4]. Штаммы, которые имеют степень родства (R) 70% и более, относятся к одному антигенному варианту; 32–70% – к различным антигенным вариантам; 10–32% – к антигенным вариантам, которые сильно отличаются между собой; менее 5% – к разным типам.

3.1.14 Определение иммуногенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

Кроликов, использованных в опыте по определению антигенной активности спустя 21 сутки после иммунизации, подвергали контрольному заражению вирулентными штаммами «Воронежский-87» вируса ГБК 1-го генотипа и шт. «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа в дозе 1000 ЛД₅₀. Учет результатов проводили на 10-е сутки после заражения.

Иммуногенную активность recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 для кроликов вычисляли по формуле:

$$\text{ИА} = (\text{ЛК} - \text{ЛВ}) / \text{ЛК} \times 100\%$$

ИА - иммуногенная активность

ЛК - летальность в контрольной группе (%)

ЛВ - летальность среди вакцинированных животных (%)

Каждую группу, состоящую из 10 животных, разделяли на две подгруппы по 5 кроликов и производили контрольное заражение штаммами, относящимися к разным геногруппам. 5 кроликов инфицировали шт. вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87», а оставшихся 5 кроликов - шт. вируса ГБК 2-го генотипа «Тула». Таким образом, определили, что два генотипа вируса ГБК, хоть и схожи между собой, но при заражении животные устойчивы только к тому генотипу вируса, каким были иммунизированы.

3.1.15 Проведение ИФА для выявления специфических антител к вирусу ГБК у кроликов

Для подбора «подложки» растворы recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 на 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9,6 в разных концентрациях по белку и соотношении сорбировали на иммунологический планшет в объеме 100 мкл.

Для дальнейших исследований recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 сорбировали на иммунологический планшет в объеме 100 мкл в соотношении 1:1 на КББ с конечной концентрацией по белку 10 мкг\мл.

Инкубировали в течение 12-18 часов при 4°C, затем содержимое планшета резким движением скидывали и промывали стандартным фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБТ).

Отмытый планшет блокировали свежеприготовленным 1% раствором TOP block содержащий 1% Gelatine Blocking Grade в ФСБТ в течение 1 часа при температуре 37°C, после чего блокирующий раствор сливали и промывали 2 раза в ФСБТ.

В качестве исследуемого материала использовали сыворотки крови кроликов. Исследуемые сыворотки разводили 1:200 на буфере для разведения (БР) и проводили титрацию на БР с шагом 2 (1:200, 1:400 и т.д.).

В качестве K⁺ использовали сыворотку крови кролика, заведомо содержащую антитела к вирусу ГБК.

В качестве К- использовали сыворотку крови кролика, не содержащую антитела к вирусу ГБК.

После внесения на планшет по 100 мкл разведенных сывороток крови и контроля, планшет инкубировали 1 час при 37°C. Затем содержимое планшета резко скидывали и проводили 4-кратную промывку по 350 мкл ФСБТ. Следующим этапом вносили по 100 мкл пероксидазного конъюгата к IgG кролика (Abscam, Великобритания) в разведении 1:400 на БР и инкубировали 1 час при 37°C. После инкубирования содержимое планшета удаляли и проводили 4-кратную промывку ФСБТ по 350 мкл. После этого вносили хромоген-субстратный раствор (ТМБ) 100 мкл и оставляли при комнатной температуре в темном месте в течение 15 мин, затем останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1М H₂SO₄. Учет реакции проводили на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Результаты интерпретировали по следующим показателям:

1. Значение A450 для «отрицательной» сыворотки не должно превышать 0,200.
2. Значение A450 для «положительной» сыворотки не должно быть ниже значения 0,800.
3. Положительной для испытуемых сывороток считали реакцию, если окраска лунок превышала значение A450 для «отрицательной» сыворотки не менее чем в два раза.

3.1.16 Применение разработанной тест-системы (АТ-ВГБК) для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу ГБК у кроликов

В работе по оценке напряженности поствакцинального иммунитета к ВГБК у кроликов с помощью разработанной тест-системы использовали 30 сывороток кроликов, вакцинированных коммерческими вакцинами против ВГБК.

Сыворотку, полученную из крови не иммунизированных кроликов и сыворотку через 21 сутки после иммунизации вакциной против вирусной геморрагической болезни кроликов тканевой инактивированной гидроокисью алюминия (организация-разработчик- ФГБНУ ФИЦВиМ) исследовали в разработанной тест-системе.

3.1.17. Определение чувствительности и специфичности разработанных тест-систем.

Чувствительность и специфичность разработанных в данной научной работе тест-систем определяли согласно «*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*», 2004, http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00013.htm по формулам:

$$\text{ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ} = \left(\frac{a}{a+c}\right) \times 100\%$$

$$\text{СПЕЦИФИЧНОСТЬ} = \left(\frac{d}{d+b}\right) \times 100\%$$

где:

- $a + c$ – общее количество референтных положительных проб.
 a – число положительных проб, получаемых в испытываемой тест-системе
 c – число положительных проб, не выявляемых в испытываемой тест-системе (ложноотрицательные пробы);
- $d + b$ – общее количество референтных отрицательных проб.
 d – число отрицательных проб, полученных в испытываемой тест-системе (истинно отрицательные пробы);
 b – число отрицательных проб, не выявленных в испытываемой тест-системе (ложноположительные пробы).

Совпадаемость полученных результатов определяли по следующей формуле:

$$\text{СОВПАДАЕМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ} = \left(\frac{a + d}{(a + c) + (d + b)} \right) \times 100\%$$

3.1.18 Проведение сэндвич-ИФА для выявления вируса ГБК в патологическом материале и recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости

В работе использовали МАТ, полученные на recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в АНО «НИИДПБ» и пероксидазные конъюгаты на их основе.

В лунки иммунологического полистиролового планшета вносили 100 мкл раствора моноклональных антител к главному капсидному белку VP60 вируса ГБК на КББ из расчета 10 мкг белка на лунку и в течение 18-24 часов инкубировали при температуре 4-8°C, следующим этапом шла четырехкратная промывка планшета, при этом вносили по 350 мкл ФСБТ в каждую лунку. Отмытый планшет блокировали свежеприготовленным 1% раствором TOP block в ФСБТ в течение 1 часа при температуре 37°C, после чего блокирующий раствор сливали.

В лунки планшета вносили образцы в 2-х повторах в объеме 100 мкл. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали 1 час при температуре 37 °С. Далее планшет промывали 4 раза внося 350 мкл ФСБТ. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл конъюгата в разведении 1:400 на буфере для разведения, заклеивали пленкой планшет и инкубировали 1 час при температуре 37 °С. Далее планшет промывали 4 раза внося 350 мкл ФСБТ и вносили хромоген-субстратную смесь в объеме 100 мкл и инкубировали планшет в темном месте в течении 15 минут. После инкубации добавляли 50 мкл стоп раствора. Учет результатов реакции проводили на спектрофотометре с длиной волны 450 нм.

Результаты интерпретировали, по следующим показателям:

1. Значение А450 для «отрицательного» контроля не должно превышать 0,2.

2. Значение А450 для «положительного» контроля не должно быть ниже значения 0,5.

3. Положительной для испытуемых образцов считали реакцию, если окраска лунок превышала значение А450 для «отрицательного» контроля не менее чем в два раза.

3.1.19 Исследование образцов патологического материала полученного от павших и больных животных

В лабораторию были доставлены образцы печени от животных, которые исследовали на наличии АГ в разработанной тест-системе. Полученные образцы печени измельчали ножницами, а затем растирали в стерильной ступке и добавляли фосфатно-буферный раствор рН 6,5-7,2. Полученную суспензию центрифугировали при 3000 об / мин в течение 10 мин. Полученный супернатант использовали для постановки ИФА.

Для подтверждения полученных результатов в разработанной тест системе, были проведены исследования этих проб методом ПЦР. Для этого применяли праймеры: 5'-саа cgt get cca gtt ttg gta cg-3', 5'-att ctg tct ggt tgg ggc gtg t-3' [5, 14].

4. Результаты собственных исследований

4.1 Нуклеотидная последовательность генома и филогенетический анализ штамма «Тула» вируса ГБК

В результате проведенных работ была определена полная нуклеотидная последовательность генома и проведен филогенетический анализ штамма «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа (рис. 5).

Филогенетическая дендрограмма вируса ГБК 2-го генотипа штамм «Тула»



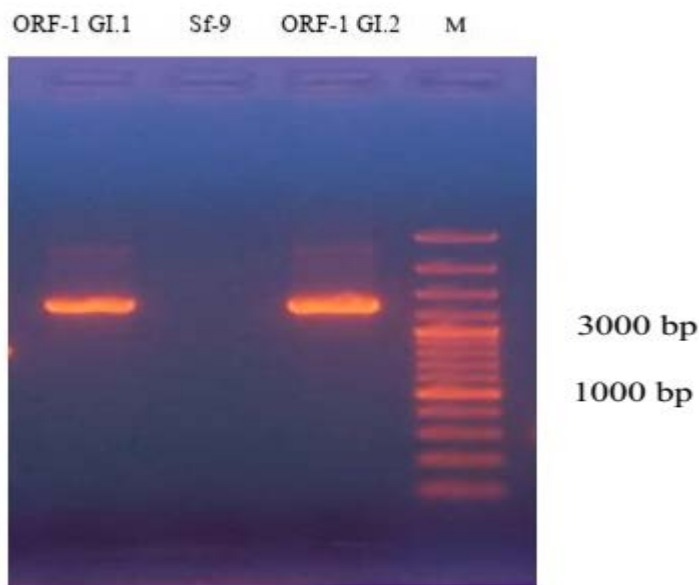
* Исследуемый вирус обозначен •

По представленной филогенетической дендрограмме, выделенный вирус ГБК 2-го генотипа штамма «Тула», наиболее близок к вирусам из США, Франции и Польши, выделенным в период 2016–2020 годов [12].

Получены рекомбинантные вирусы ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographa californica* со вставкой ORF-1 вируса ГБК генотипа GI.1 (AcORF-1- GI1) и генотипа GI.2 (AcORF-1- GI.2).

Определение наличия нуклеотидных последовательностей ORF-1 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 посредством амплификации участка нуклеотидной последовательности, включающей фрагмент генома вируса ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographa californica* и части экспрессионной кассеты с геном ORF-1 вируса ГБК генотипов GI.1 или GI.2 показало их наличие, рисунок 6.

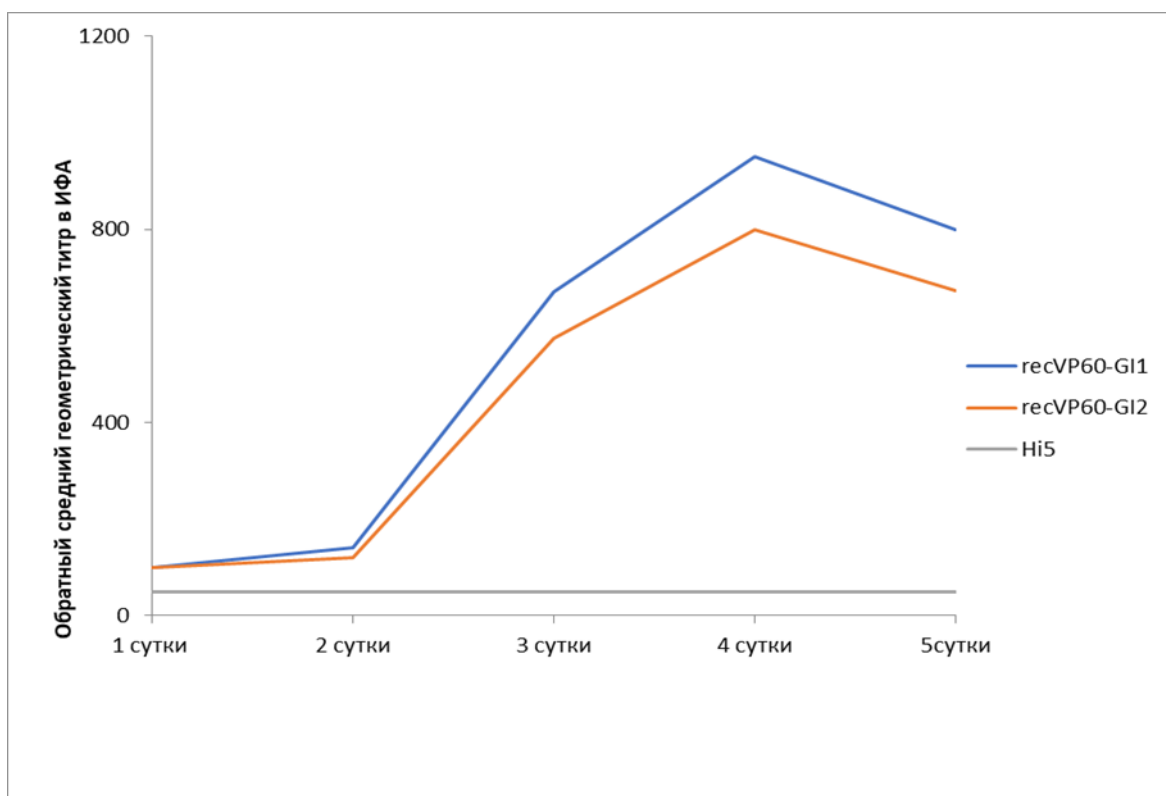
Электрофорезграмма амплифицированных фрагментов геномов рекомбинантных бакуловирусов



При инфицировании культуры клеток Sf-9 рекомбинантными бакуловирусами наблюдали цитопатические изменения в культуре клеток на 3-4-е сутки. Полученные вирусосодержащие суспензии титровали методом «бляшкообразования», в результате выявили наличие рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-GI.1 и AcORF-1-GI.2 в титрах $10^{5,0}$ - $10^{5,5}$ ТЦД₅₀/см³ [13].

4.2 Определение уровня экспрессии recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

При определении уровня экспрессии recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 применяли метод титрования АГ в ИФА и определили, что на 3-4-е сутки после заражения культуры клеток рекомбинантными бакуловирусами с множественностью 0,1 ТЦД₅₀/клетку происходит максимальное относительное накопление антигенов, рисунок 7.

Динамика накопления *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2* в к.кл. Hi5

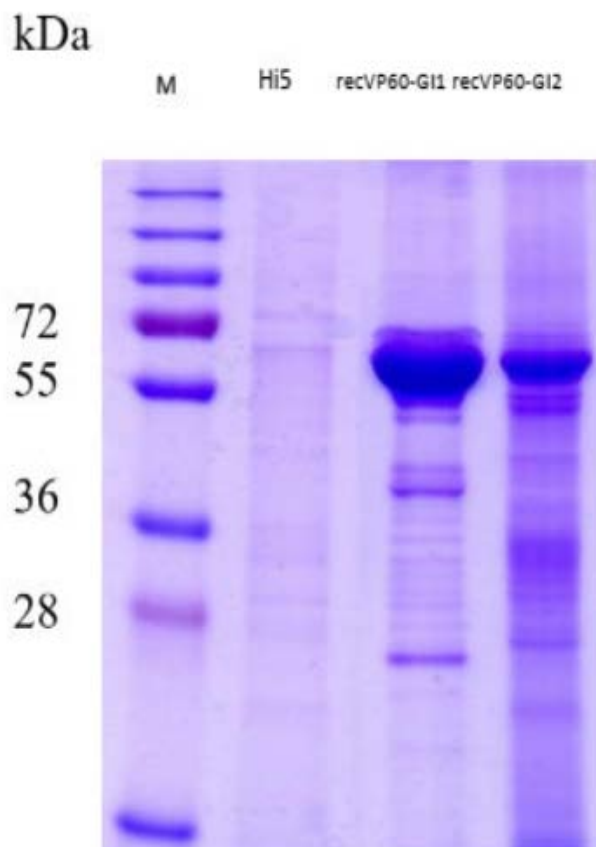
После очистки 1г клеточных осадков было получено 5 мл препарата *recVP60-GI.1* с концентрацией общего белка $20 \text{ мг}\text{/}\text{см}^3$ и 4 мл препарата *recVP60-GI.2* с концентрацией общего белка $18 \text{ мг}\text{/}\text{см}^3$ [13].

4.3 Электрофорез и иммуноблоттинг *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2*

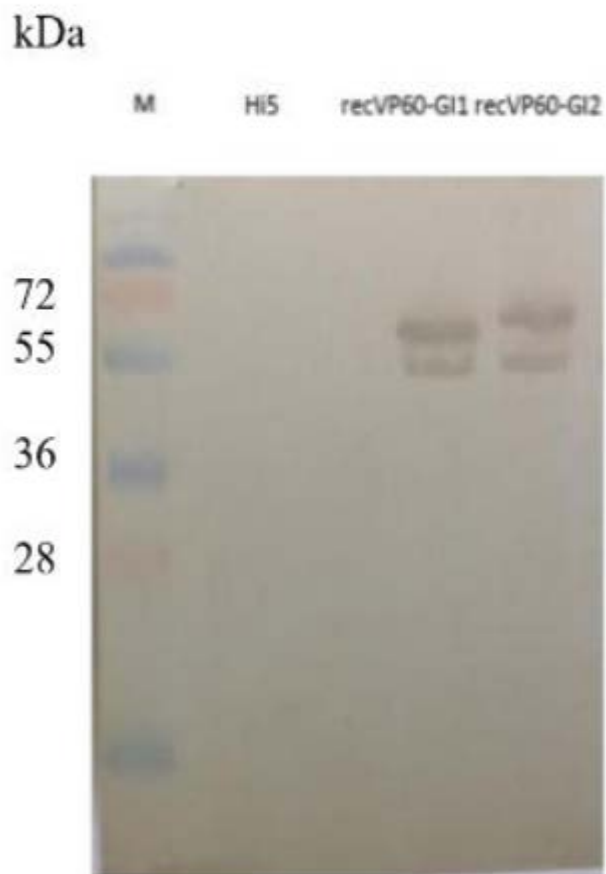
Электрофорез в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг после электрофоретического разделения показал наличие в пробах белков с мол. массой около 60 kDa, которые окрасились МАТ к структурному белку капсида вируса геморрагической болезни кроликов мечеными пероксидазой хрена, рисунки 8 и 9.

Рисунок 8.

*Результаты определения мол. массы recVP60 методом электрофо-
реза в ПААГ*



Результаты определения специфичности *recVP60* методом иммуноблоттинга



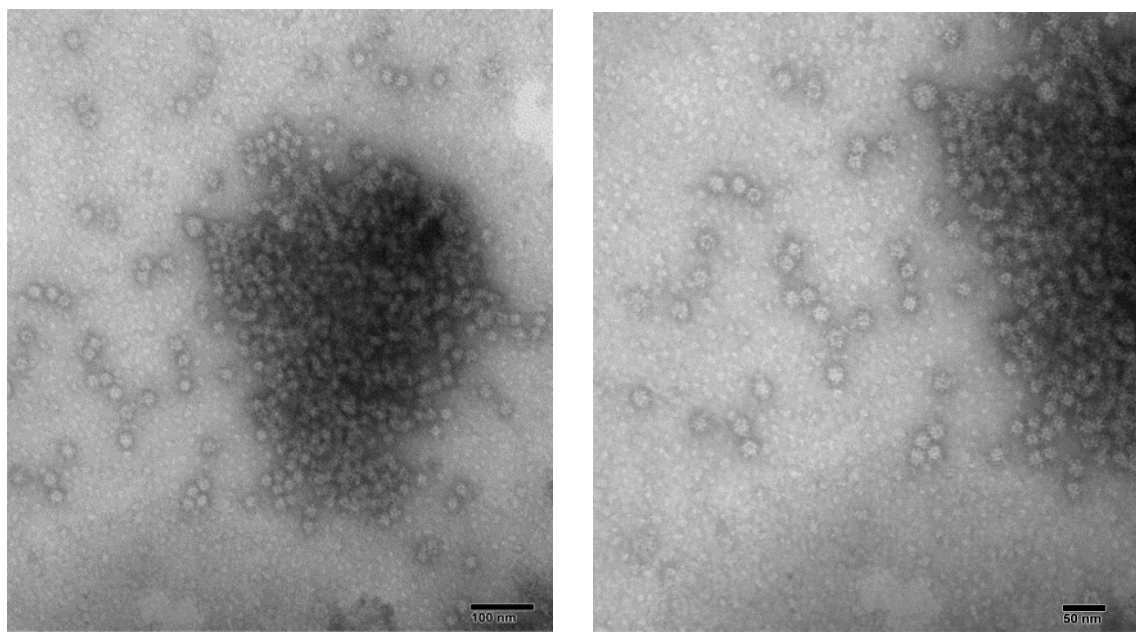
При проведении РГА определили, что гемагглютинирующая активность очищенных препаратов *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2* с концентрацией 50 мкг\см³ в PBS составила 1:32000.

В PBS с рН 7,2-7,4 рекомбинантные белки образуют ВПЧ. В препаратах *recVP60-GI.1*, *recVP60-GI.2* и их смеси 1:1 с концентрацией по общему белку 10 мг\мл при проведении электронной микроскопии фиксировали ВПЧ размером 15-30 нм (рисунки 10 и 11) [13].

4.4 Электронная микроскопия ВПЧ recVP60

Рисунок 10 и 11.

Электронно-микроскопическое изображение ВПЧ recVP60 [13].



4.5 Определение антигенной активности recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

Следующим этапом нашей работы было определение антигенной активности полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 и оценка их антигенного родства между собой и с вирусами ГБК 1-го и 2-го генотипов в РТГА.

Результаты проведенных исследований по определению антигенной активности полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 для кроликов представлены в таблицах 2-4.

В опыте использовали животных, которые до вакцинации были серонегативны в отношении вируса ГБК. Уровень их антител при проведении ИФА составил $< 1:200$ (данное значение разведения сыворотки кроликов является минимальным, которое применяется в тест-системе при проведении ИФА), в РТГА с нативными вирусными антигенами и recVP60 уровень антител составил $< 1:40$ (данное значение разведения сыворотки является минимальным, которое применяют при проведении РТГА. Торможение агглютинации в разведение $1:40$ и ниже принимали за неспецифическое) [1].

После однократного введения 50 мкг рекомбинантных капсидных белков у всех иммунизированных кроликов на 21 сутки наблюдалась выраженная сероконверсия – отмечался синтез специфических антител к главным капсидным белкам вируса ГБК, которые выявляются, как в ИФА, так и в РТГА.

Уровень антител к recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 составил 1:400-1:800 ($8,64 - 9,64 \log_2$) и 1:1280-1:2560 ($10,32 - 11,32 \log_2$) в ИФА и РТГА соответственно (табл. 2, 3, 4). У кроликов контрольной группы, сероконверсии не наблюдалось (табл. 5).

Для оценки антигенного родства полученных recVP60 между собой и с вирусами ГБК 1-го и 2-го генотипов использовали РТГА.

Результаты перекрестного титрования в РТГА с 8 ГАЕ различных антигенов вируса ГБК сывороток крови кроликов к ним, представлены в таблице 6.

Таблица 2.

Результаты выявления специфических антител в РТГА и ИФА к вирусу ГБК у кроликов, иммунизированных *rec VP60-GI.1*

АГ для иммунизации, доза, метод введения	Кол-во кроликов	Титр АТ в РТГА (\log_2) с различными АГ (8ГАЕ)								Титр АТ при проведении ИФА (\log_2)	
		<i>rec VP60-GI1</i>		<i>rec VP60-GI2</i>		шт. «Воронежский-87» (1-ый генотип)		шт. «Тула» (2-ой генотип)			
		До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
<i>recVP60-GI.1</i> 50 мкг в/м	N=10	<5,32*	10,61	<5,32	7,90	<5,32	10,61	<5,32	7,61	<7,64	9,40

*здесь и далее указано среднее геометрическое значение по группе

Таблица 3.

Результаты выявления специфических антител в РТГА и ИФА к вирусу ГБК у кроликов, иммунизированных гес VP60-GI.2

АГ для иммунизации, доза, метод введения	Кол-во кроликов	Титр АТ в РТГА (\log_2) с различными АГ (8ГАЕ)								Титр АТ в ИФА (\log_2)	
		гес VP60-GI1		гес VP60-GI2		шт. «Воронежский-87» (1-ый генотип)		шт. «Тула» (2-ой генотип)			
		До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
гес VP60-GI.2 50 мкг в/м	N=10	<5,32	7,70	<5,32	10,61	<5,32	7,80	<5,32	10,71	<7,64	8,83

Таблица 4.

Результаты выявления специфических антител в РТГА и ИФА к вирусу ГБК у кроликов, иммунизированных рес VP60-GI.1+ рес VP60-GI.2

АГ для иммунизации, доза, метод введения	Кол-во кроликов	Титр АТ в РТГА (\log_2) с различными АГ (8ГАЕ)								Титр АТ в ИФА (\log_2)	
		рес VP60-GI.1		рес VP60-GI.2		шт. «Воронежский-87» (1-ый генотип)		шт. «Тула» (2-ой генотип)			
		До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
рес VP60-GI.1 25 мкг + рес VP60-GI.2 25 мкг в/м	N=10	<5,32	10,51	<5,32	10,42	<5,32	10,51	<5,32	10,51	<7,64	9,41

Таблица 5.

Результаты выявления специфических антител в РТГА и ИФА к вирусу ГБК у невакцинированных кроликов

АГ для иммунизации, доза, метод введения	Кол-во кроликов	Титр АТ в РТГА (\log_2) с различными АГ (8ГАЕ)								Титр АТ в ИФА (\log_2)	
		rec VP60-GI.1		rec VP60-GI.2		шт. «Воронежский-87» (1-ый генотип)		шт. «Тула» (2-ой генотип)			
		День «0»	День «21»	День «0»	День «21»	День «0»	День «21»	День «0»	День «21»	День «0»	День «21»
Не вакцинированные	N=10	<5,32	<5,32	<5,32	<5,32	<5,32	<5,32	<5,32	<5,32	<7,64	<7,64

Таблица 6.

Среднее геометрическое значение уровня антител в РТГА у кроликов к вирусу ГБК по группам

Сыворотка крови Кролика к АГ	Титр АТ в РТГА (\log_2) с различными АГ (8ГАЕ)			
	rec VP60-GI.1	rec VP60-GI.2	Вирус ГБК 1-го генотипа шт. «Воронежский-87»	Вирус ГБК 2-го генотипа шт. «Тула»
rec VP60-GI.1	10,61	7,90	10,61	7,61
rec VP60-GI.2	7,70	10,61	7,80	10,71
Вируса ГБК 1-го генотипа шт. «Воронежский-87»	11	7	11	7
Вируса ГБК 2-го генотипа шт. «Тула»	7	10	8	11

4.6 Антигенное родство штаммов двух генотипов вируса ГБК и полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2

Антигенное родство штаммов вируса ГБК 1-го и 2-го генотипов с полученными recVP60 рассчитывали по формуле Архетти и Хорсфала (таблица 7).

Таблица 7.

Антигенное родство штаммов вируса ГБК 1-го, 2-го генотипов и рекомбинантных главных капсидных белков в РТГА

	recVP60-GI.1	recVP60-GI.2	шт. «Воронежский-87»	шт. «Тула»
recVP60-GI.1	---	73%	99%	72%
recVP60-GI.2	73%	---	74%	97%
шт. «Тула»	-	-	73%	-

Определение антигенного родства между **recVP60-GI.1** и **recVP60-GI.2**

$$r_1 = \frac{7,90}{10,61} \quad r_2 = \frac{7,70}{10,61}$$

$$R = 100 \times \sqrt{0,74 \times 0,73} = 100 \times \sqrt{0,54} = 73\%$$

Определение антигенного родства между **recVP60-GI.1** и шт. вируса

ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87»

$$r_1 = \frac{10,61}{10,61} \quad r_2 = \frac{7,70}{7,80}$$

$$R = 100 \times \sqrt{1 \times 0,98} = 100 \times \sqrt{0,99} = 99\%$$

Определение антигенного родства между **recVP60-GI.1** и шт. вируса

ГБК 2-го генотипа «Тула»

$$r_1 = \frac{7,61}{10,61} \quad r_1 = \frac{7,70}{10,71}$$

$$R = 100 \times \sqrt{0,72 \times 0,72} = 100 \times \sqrt{0,52} = 72\%$$

Определение антигенного родства между **recVP60-GI.2** и шт. вируса

ГБК 2-го генотипа «Тула»

$$r_1 = \frac{7,61}{7,90} \quad r_1 = \frac{10,61}{10,71}$$

$$R = 100 \times \sqrt{0,96 \times 0,99} = 100 \times \sqrt{0,95} = 97\%$$

Определение антигенного родства между **recVP60-GI.2** и шт. вируса

ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87»

$$r_1 = \frac{7,90}{10,61} \quad r_1 = \frac{7,80}{10,61}$$

$$R = 100 \times \sqrt{0,74 \times 0,74} = 100 \times \sqrt{0,55} = 74\%$$

Определение антигенного родства между шт. вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» и шт. вируса ГБК 2-го генотипа «Тула»

$$r_1 = \frac{7,61}{10,61} \quad r_1 = \frac{7,80}{10,71}$$

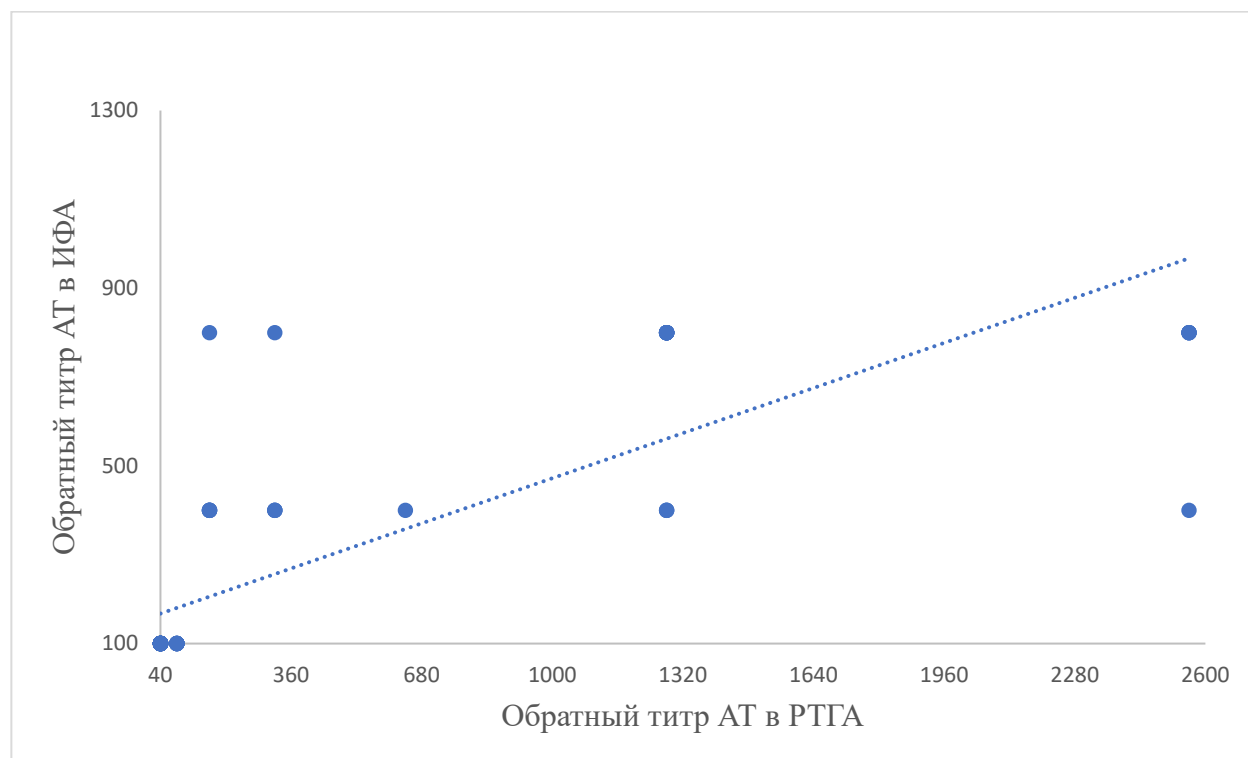
$$R = 100 \times \sqrt{0,72 \times 0,73} = 100 \times \sqrt{0,53} = 73\%$$

4.7 Определение степени корреляции полученных результатов при постановке ИФА и РТГА

Следующим этапом работы было определение корреляции между результатами ИФА и РТГА при выявлении специфических антител к главному капсидному белку вируса ГБК. Результаты проведенных исследований представлены на рис.12.

Рисунок 12.

Коррелятивная связь между титрами АТ к вирусу ГБК в сыворотках крови кроликов в ИФА и РТГА



Анализ полученных результатов свидетельствует о положительной корреляции между титрами антител к вирусу ГБК выявляемых методами ИФА и РТГА в сыворотках крови кроликов ($r=0,80$; $p<0,05$). Установлена прямая зависимость между уровнем специфических антител, выявляемым обоими методами – все отрицательные в РТГА сыворотки были отрицательными и в ИФА, а при увеличении титра в РТГА происходило увеличение титра и в ИФА.

4.8 Определение иммуногенной активности recVP60-GI.1, recVP60-GI.2 в отношении вирусов ГБК 1-го и 2-го генотипов

Кроликов, использованных в опыте по определению антигенной активности спустя 21 сутки после иммунизации, подвергли контрольному заражению вирулентным штаммом вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» и штаммом вируса ГБК 2-го генотипа «Тула».

Результаты исследования приведены в таблицах 8 и 9.

После контрольного заражения вирулентным штаммом «Воронежский-87» вируса ГБК 1-го генотипа выжили все кролики, иммунизированные recVP60-GI.1 (иммуногенная активность составила 100 % при значении летальности 0%) и 80 % животных, которым вводили смесь recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 (иммуногенная активность составила 80 % при показателе летальности 20%). Иммуногенная активность recVP60-GI.2 составила 20%, соответственно из пяти иммунизированных кроликов выжил один (летальность 80%). В контрольной группе кроликов наблюдали 100 % летальность.

После контрольного заражения вирулентным штаммом «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа выжили все кролики, иммунизированные recVP60-GI.1 и смесью recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 (иммуногенная активность составила 100 % при значении летальности 0%), иммуногенная активность recVP60-GI.1 составила 20%. В контрольной группе животных отмечалась 100 % летальность [13].

Таблица 8.

Результаты контрольного заражения кроликов штаммом «Воронежский-87» вируса ГБК

АГ для иммунизации, доза, метод введения	Кол-во жив-ых	Титр АТ в РТГА (log ₂) с различными АГ (8ГАЕ)								Титр АТ в ИФА (log ₂)		Результат контрольного заражения 1000 ЛД ₅₀ «Воронежский-87» (1-ый генотип)	
		rec VP60-GI.1		rec VP60-GI.2		шт. «Воронежский-87»		шт. «Тула»					
		До	После	До	После	До	После	До	После	До	После		
rec VP60-GI.1 50 мкг/доза в/м	N=5	5,2	10,2	5	8	5,2	10,2	5	7,2	<7,64	9,43	Пали 0	Живы 5
		Летальность 0 %								Иммуногенная активность 100%			
rec VP60-GI.2 50 мкг/доза в/м	N=5	5	7,38	5,38	10,59	5	7,58	5,38	10,39	<7,64	9,23	Пали 4	Жив 1
		Летальность 80%								Иммуногенная активность 20%			
rec VP60-GI.1 25мкг + rec VP60-GI.2 25 мкг в/м	N=5	5	10,39	5,19	10,59	5	10,39	5,37	10,39	<7,64	9,23	Пал 1	Живы 4
		Летальность 20%								Иммуногенная активность 80 %			
Контрольная группа (не вакцини- ровали)	N=5	4,78	4,78	4,96	5	5	5	5,19	5	<7,64	<7,64	Пали 5	Живы 0
		Летальность 100%											

Таблица 9.

Результаты контрольного заражения кроликов штаммом «Тула» вируса ГБК

АГ для иммунизации, доза, метод введения	Кол-во жив-ых	Титр АТ в РТГА (\log_2) с различными АГ (8ГАЕ)								Титр АТ в ИФА (\log_2)		Результат контрольного заражения 1000 ЛД ₅₀ «Тула» (2-ой генотип)	
		гес VP60-GI.1		гес VP60-GI.2		шт. «Воронежский-87»		шт. «Тула»		До	После		
		До	После	До	После	До	После	До	После				
гес VP60-GI.1 50 мкг/доза в/м	N=5	5,58	10,39	5,38	7,38	5,58	10,59	5,38	7,38	<7,64	9,43	Пали 4	Жив 1
		Летальность 80%								Иммуногенная активность 20%			
гес VP60-GI.2 50 мкг/доза в/м	N=5	5,38	7,58	5	10,19	5,38	7,38	5	10,39	<7,64	9,43	Пали 0	Живы 5
		Летальность 0%								Иммуногенная активность 100%			
гес VP60-GI.1 + гес VP60-GI.2 50 мкг/доза в/м	N=5	5	10,19	5	10,19	5,19	10,39	5	10,39	<7,64	9,43	Пали 0	Живы 5
		Летальность 0%								Иммуногенная активность 100%			
Контрольная группа (не вакцинировали)	N=5	4,78	4,78	4,96	5	5	5	5,19	5	<7,64	<7,64	Пали 5	Живы 0
		Летальность 100%											

4.9 Разработка сэндвич-ИФА (АТ-ВГБК) на основе recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 для выявления антител к вирусу ГБК

На первом этапе работы были отработаны условия приготовления «подложки», для чего на планшеты сорбировали recVP60-GI.1, recVP60-GI.2 и их смесь в соотношении 1:1 в различных концентрациях и на этих подложках ставили ИФА с положительными к recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 и отрицательными сыворотками крови кролика.

Шахматное титрование рекомбинантных белков с положительными и отрицательной сыворотками крови кролика показало, что для сенсibilизации планшета достаточно 10 мкг/лунку антигена, причем, использование смеси рекомбинантных антигенов позволяет с высокой чувствительностью определять антитела к капсидному белку вируса ГБК двух генотипов, рисунки 13-15.

Рисунок 13.

Взаимодействие recVP60-GI.1 с положительной и отрицательной сыворотками крови кролика

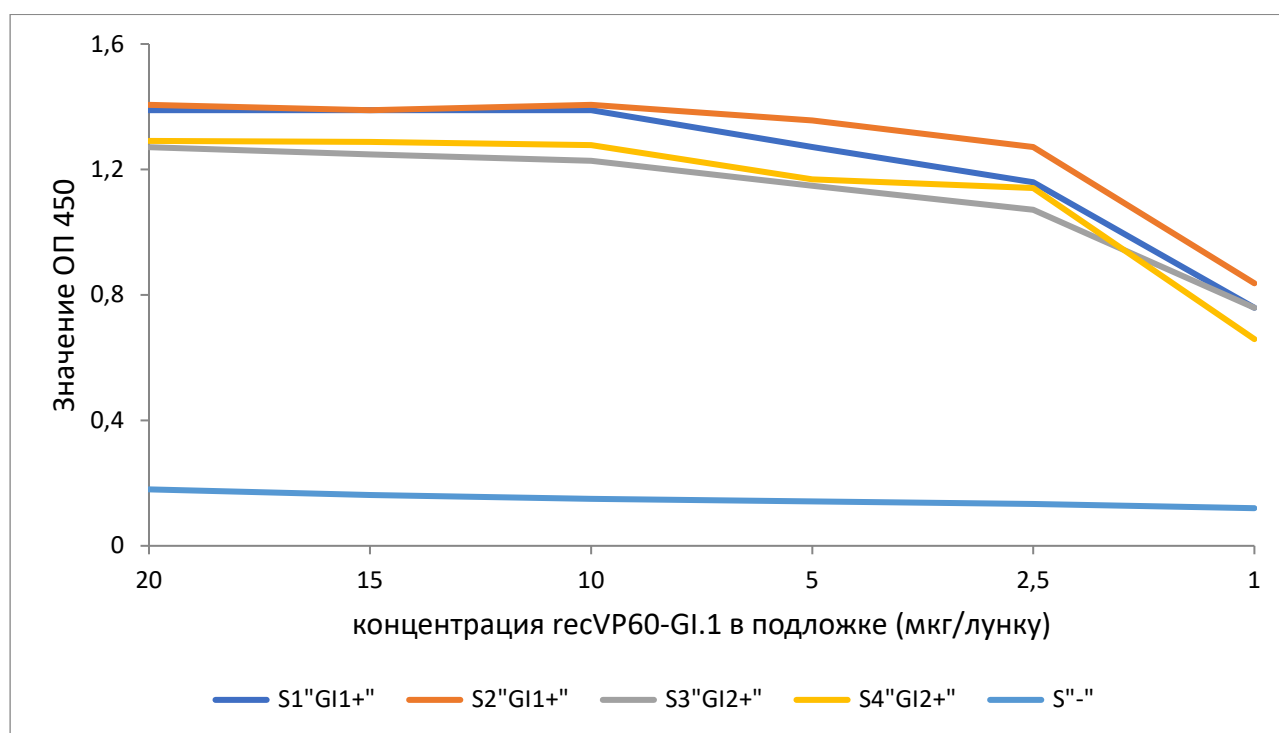


Рисунок 14.

Взаимодействие recVP60-GI.2 с положительной и отрицательной сыворотками крови кролика

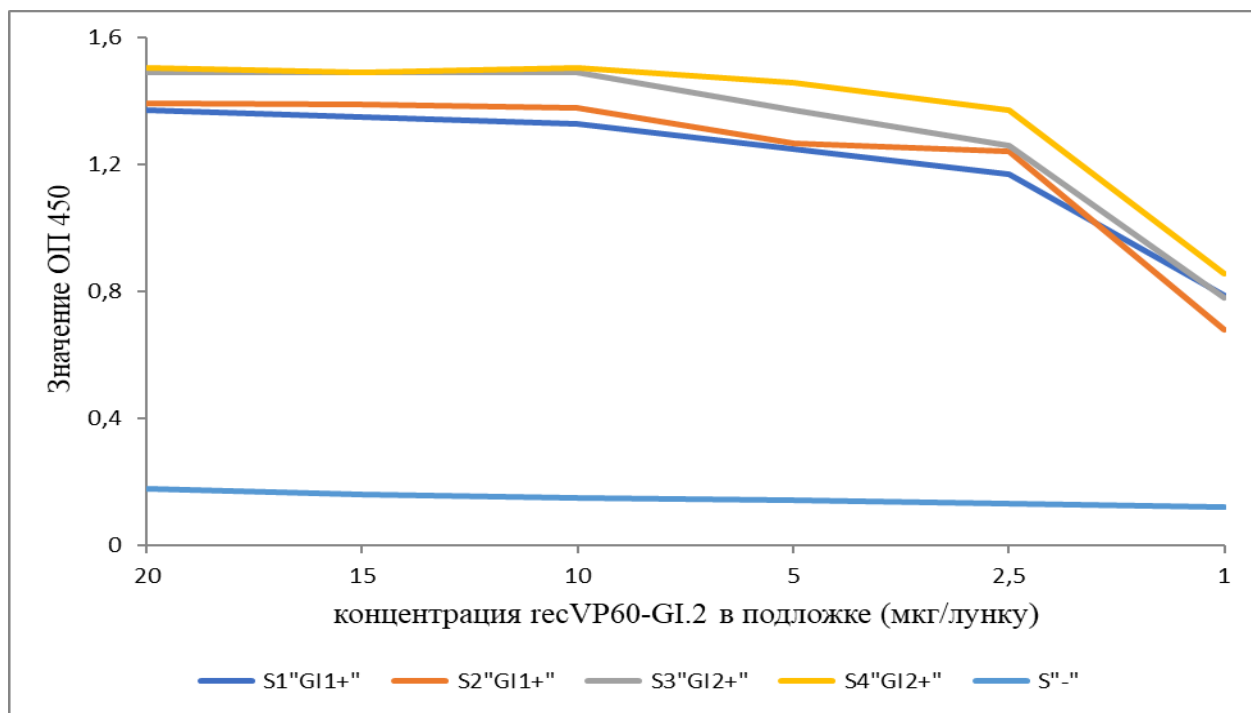
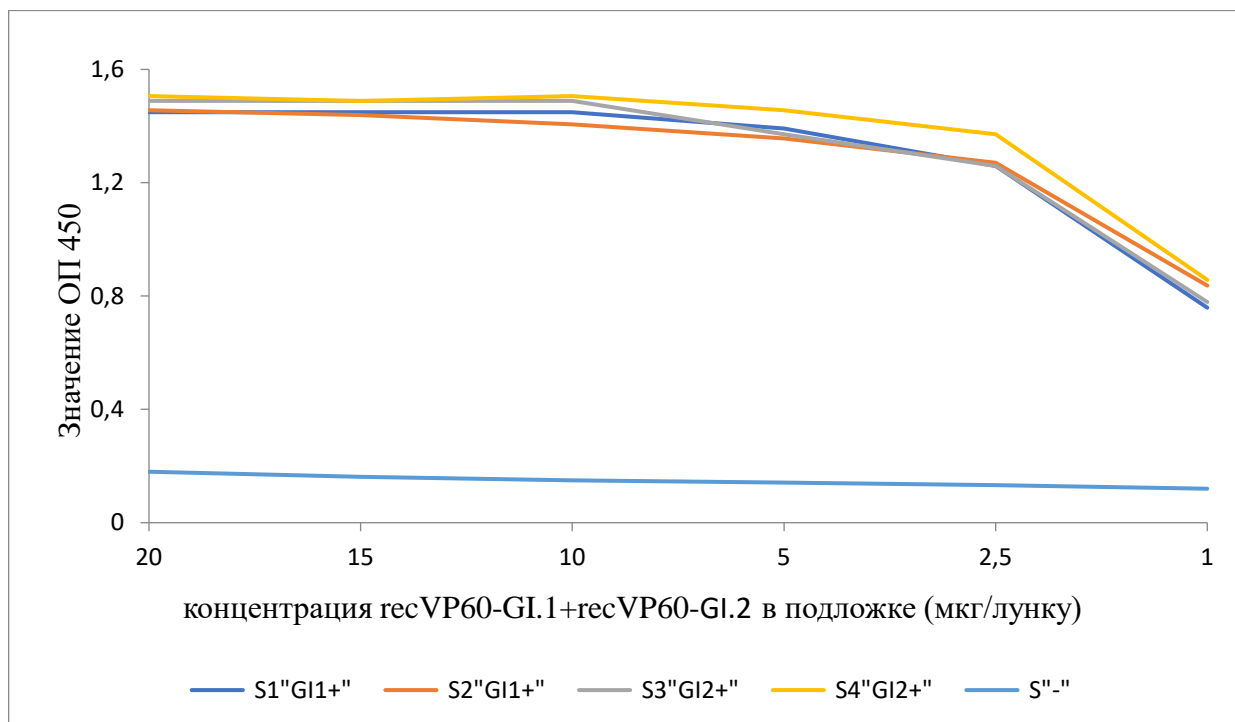


Рисунок 15.

Взаимодействие recVP60-GI.1+ recVP60-GI.2 с положительной и отрицательной сыворотками крови кролика



Титрование положительных к recVP60-GI.1, recVP60-GI.2 и отрицательных сывороток крови кроликов на подложках, содержащих recVP60-GI.1, recVP60-GI.2 и их смесь в соотношении 1:1 в концентрации 10 мкг\лунку показало, что применение смеси антигенов позволяет увеличить чувствительность системы для выявления антител к главному капсидному белку вируса ГБК не зависимо от генотипа вируса, рисунки 16-18.

Рисунок 16.

Результаты титрования положительных и отрицательных сывороток в ИФА с «подложкой» rec VP60-GI.1

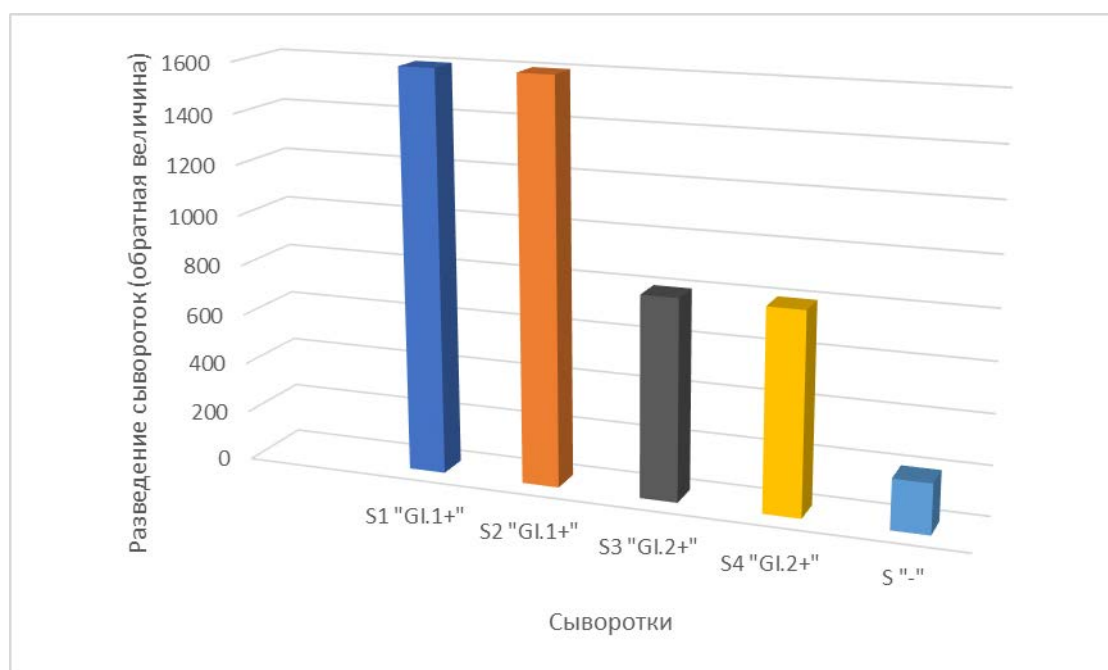


Рисунок 17.

Результаты титрования положительных и отрицательных сывороток в ИФА с «подложкой» res VP60-GI.2

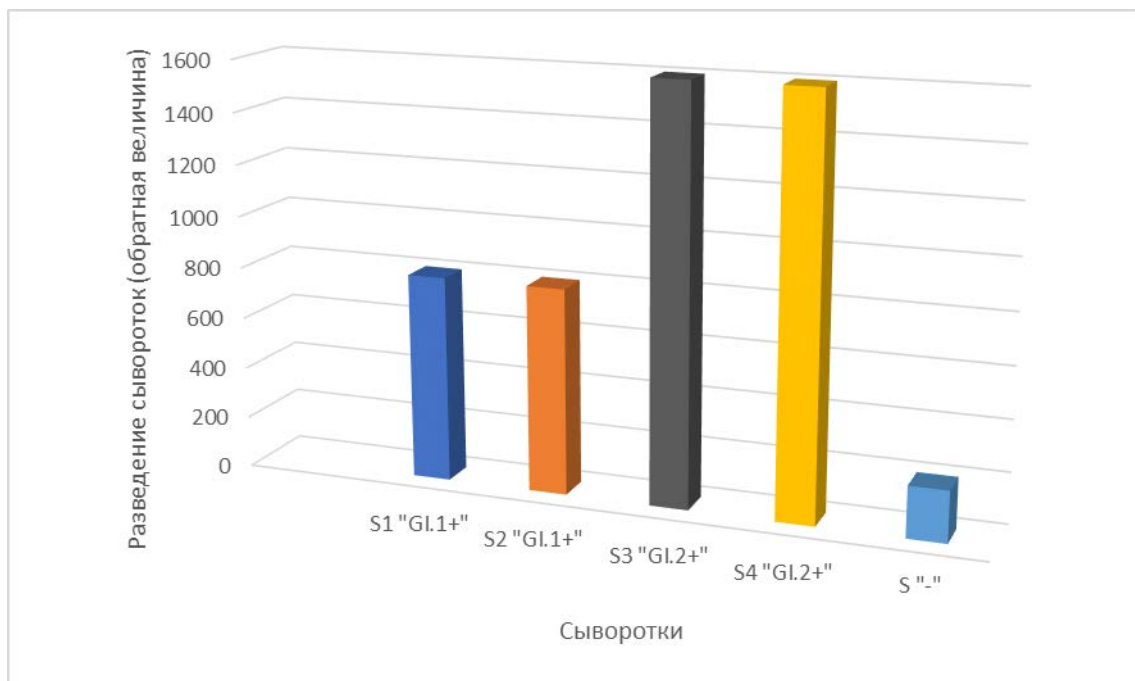
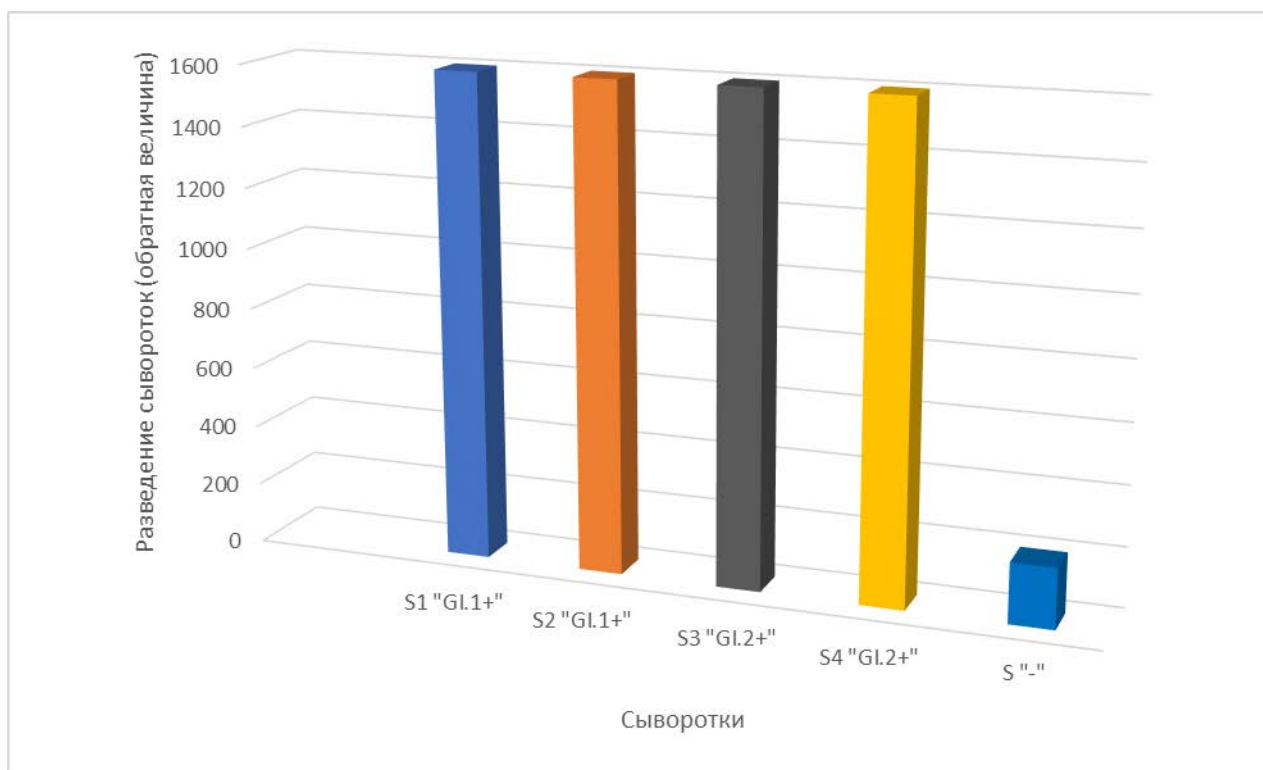


Рисунок 18.

Результаты титрования положительных и отрицательных сывороток в ИФА с «подложкой» res VP60-GI.1+ res VP60-GI.2



4.10 Определение чувствительности и специфичности разработанного сэндвич-ИФА (АТ-ВГБК) на основе гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 для выявления антител к вирусу ГБК

В ходе научной работы, стояла задача по определению специфичности и чувствительности разработанной тест-системы (АТ-ВГБК) в сравнении с ИФА INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1 («Ingenaza», Испания), который использовали в качестве референтного метода. Для этого производили титрование сывороток крови невакцинированных кроликов, кроликов, иммунизированных гесVP60-GI.1, гесVP60-GI.2 и их смесью, кроликов, иммунизированных коммерческими вакцинами против ВГБК в обеих системах. Результаты представлены в таблице 10-11 и на рисунке 19.

Таблица 10.

Результаты титрования сывороток крови кроликов при проведении ИФА в разработанной тест-системе и INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1 («Ingenaza», Испания)

Кол-во животных	Вид исследуемого материала	Титр АТ в INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1 Ср.геом. титр, обратная величина	Интерпретация результатов	Титр АТ в разработанной тест-системе Ср.геом. титр, обратная величина	Интерпретация результатов
N=20	Сыворотки крови кроликов до иммунизации	<1:200	Отрицательные	<1:200	Отрицательные
N=10	Сыворотки крови кроликов иммунизированных гесVP60-GI.1	857	Положительные	800	Положительные

N=10	Сыворотки крови кроликов иммунизированных recVP60-GI.2	741	Положительные	528	Положительные
N=10	Сыворотки крови кроликов иммунизированных смесью recVP60-GI.1+ recVP60-GI.2	746	Положительные	606	Положительные
51	Сыворотки крови от случайных-бренных кроликов	<1:200	Отрицательная	1:200	Положительная
52		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
53		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
54		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
55		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
56		1:200	Положительная	<1:200	Отрицательная
57		1:200	Положительная	1:200	Положительная
58		1:200	Положительная	1:200	Положительная
59		1:200	Положительная	1:200	Положительная
60		1:400	Положительная	1:400	Положительная
61		1:400	Положительная	1:400	Положительная
62		1:200	Положительная	1:400	Положительная
63		1:200	Положительная	1:400	Положительная
64		1:400	Положительная	1:200	Положительная
65		1:800	Положительная	1:800	Положительная
66		1:800	Положительная	1:800	Положительная
67		1:400	Положительная	1:800	Положительная
68		1:800	Положительная	1:400	Положительная
69		1:800	Положительная	1:400	Положительная
70		1:800	Положительная	1:800	Положительная
71		1:800	Положительная	1:800	Положительная
72		1:200	Положительная	1:200	Положительная
73		1:200	Положительная	1:200	Положительная
74		1:200	Положительная	1:200	Положительная
75		1:200	Положительная	1:200	Положительная
76		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
77		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
78		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
79		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная
80		<1:200	Отрицательная	<1:200	Отрицательная

Результаты исследования сывороток крови кроликов в разработанной тест-системе ИФА (АТ-ВГБК) и в ИФА INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1 («Ingenaza», Испания)

		Результаты в ИФА INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1	
		положительных	отрицательных
		Всего проб 80, из них:	
		50	30
Результаты в разработанной тест-системе Всего проб 80, из них:	положительных	49	1
	отрицательных	1	29

Таким образом, диагностическая чувствительность разработанной тест-системы по отношению к тест-системе INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1

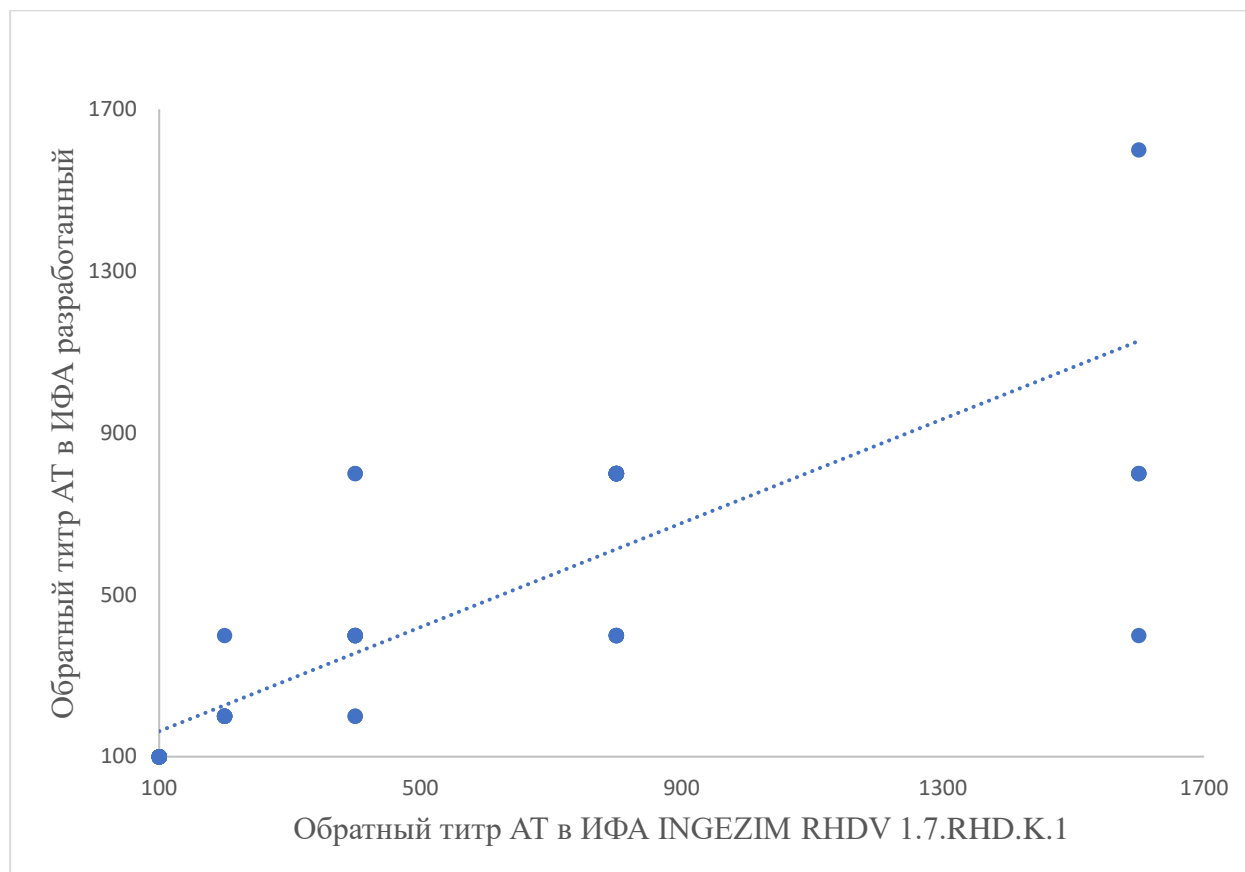
(«Ingenaza», Испания) составила:

$$\frac{49}{50} \times 100 = 98 \%;$$

диагностическая специфичность: $\frac{29}{30} \times 100 = 96,6 \%;$

совпадаемость результатов двух методов: $\frac{49+29}{(49+1)+(1+29)} \times 100 = 97,5 \%.$

Коррелятивная связь между титрами АТ к вирусу ГБК в сыворотках крови кроликов в разработанной тест-системе (АТ-ВГБК) и INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1 («Ingenaza», Испания)



Полученные результаты свидетельствует о положительной корреляции между титрами антител к вирусу ГБК выявляемых в сыворотках крови кроликов в двух тест-системах методами ИФА ($r=0,97$; $p<0,05$) (Рис. 19). При этом, для сывороток крови кроликов содержащих антитела к вирусу ГБК 2-го генотипа (группы иммунизированные recVP60-GI.2 и смесью recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 (результаты приведены в скобках)), чувствительность разработанной тест-системы была выше – средняя геометрическая обратная величина титров АТ в таких сыворотках, в разработанной тест-системе и в наборе INGEZIM RHDV 1.7.RHD.K.1 («Ingenaza», Испания) составила 741 (746) и 528 (606) соответственно (табл.10).

Результаты исследования сывороток крови при оценке напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу ГБК у кроликов, иммунизированных коммерческой вакциной в разработанной тест-системе (АТ-ВГБК) представлены в таблице 12.

Таблица 12.

Результаты исследования сывороток крови кроликов в ИФА до и после вакцинации коммерческой вакциной против ВГБК

№ животного	Титр АТ в ИФА	
	до вакцинации	после вакцинации
1	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
2	1:200 (7,64 log ₂)	1:800 (9,64 log ₂)
3	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
4	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
5	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
6	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
7	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
8	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
9	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
10	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
11	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
12	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
13	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
14	1:200 (7,64 log ₂)	1:800 (9,64 log ₂)
15	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:800 (9,64 log ₂)
16	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
17	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
18	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
19	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
20	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
21	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
22	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
23	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
24	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
25	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
26	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
27	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)
28	1:200 (7,64 log ₂)	1:800 (9,64 log ₂)
29	1:200 (7,64 log ₂)	1:800 (9,64 log ₂)
30	<1:200 (<7,64 log ₂)	1:400 (8,64 log ₂)

У всех серонегативных животных, после иммунизации наблюдалось увеличение уровня специфических антител.

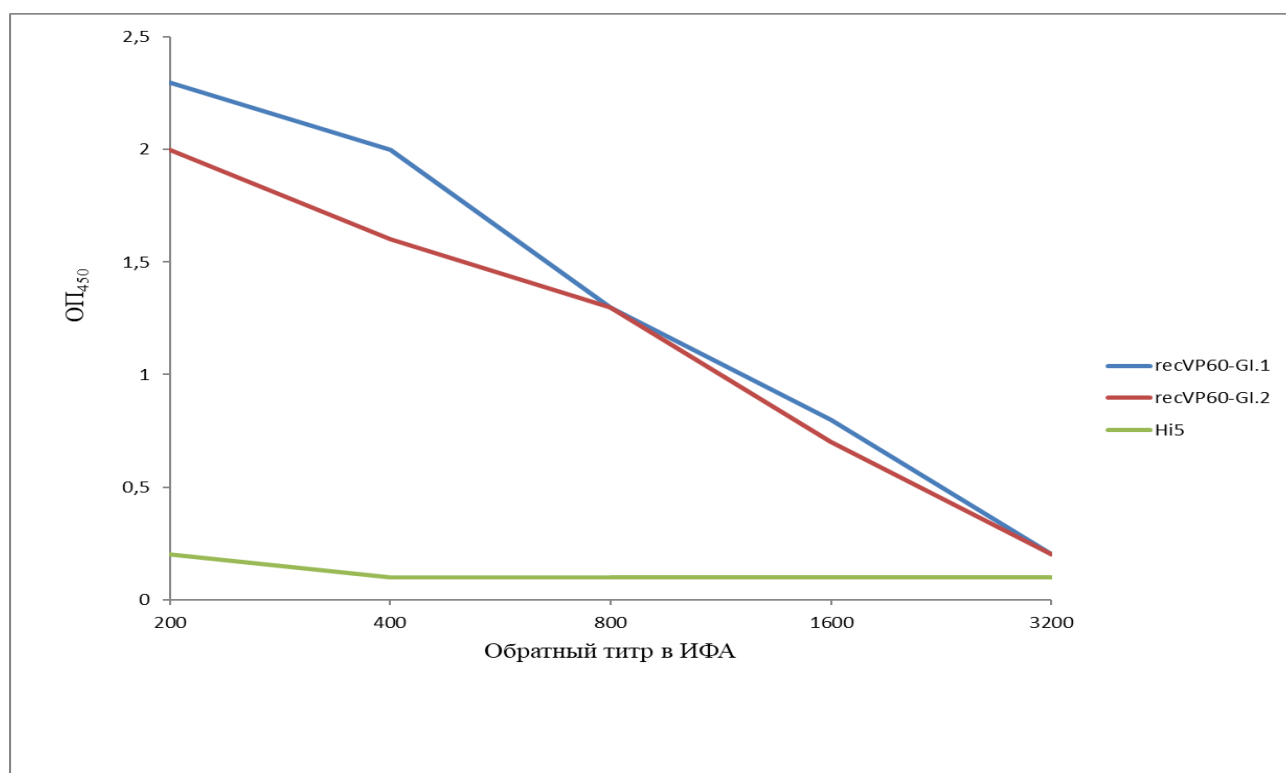
4.11 Разработка сэндвич-ИФА (АГ-ВГБК) для выявления recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости и вируса геморрагической болезни кроликов генотипов GI.1 и GI.2 в патологическом материале

На основе полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в АНО «НИИДПБ» были получены моноклональные АТ к главным капсидным белкам вируса ГБК.

На очищенных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 была подобрана пара мАТ («подложка» и мАТ меченные пероксидазой хрена), которая позволяла выявлять капсидные белки вируса ГБК 1-го и 2-го генотипов. Результаты титрования рекомбинантных капсидных белков вируса ГБК представлены на рисунке 20.

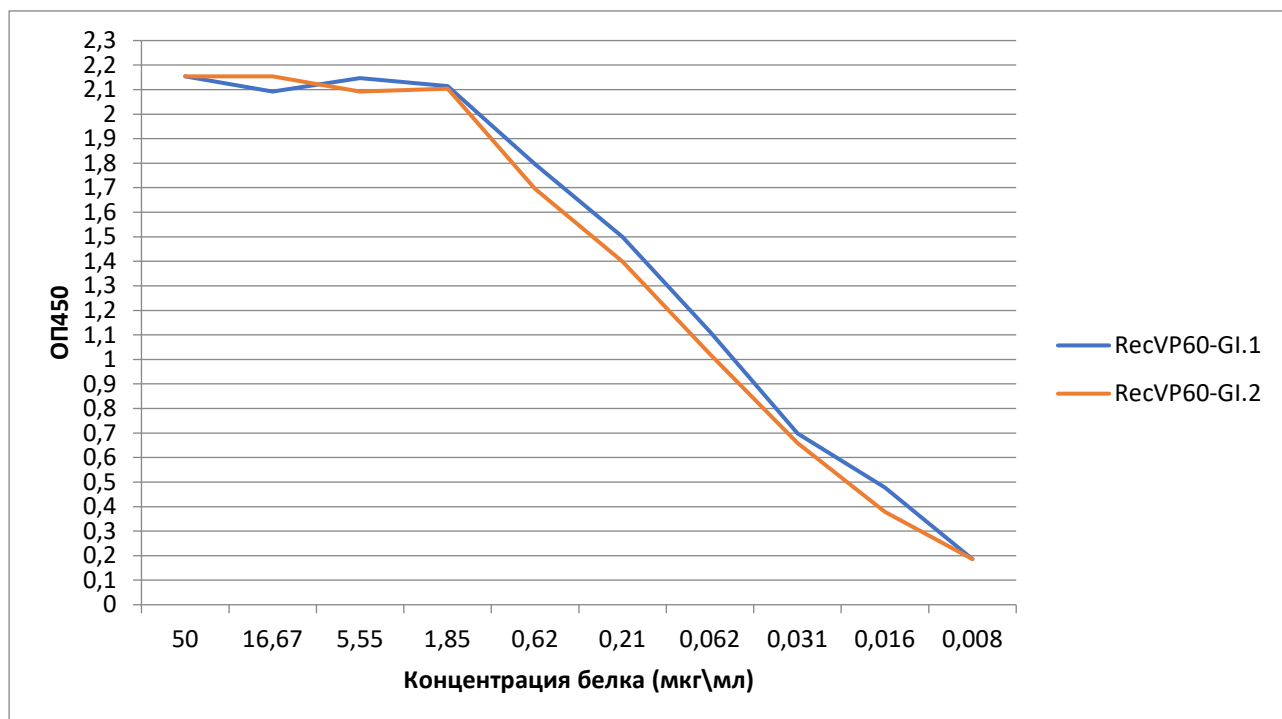
Рисунок 20.

Результаты титрования recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в ИФА



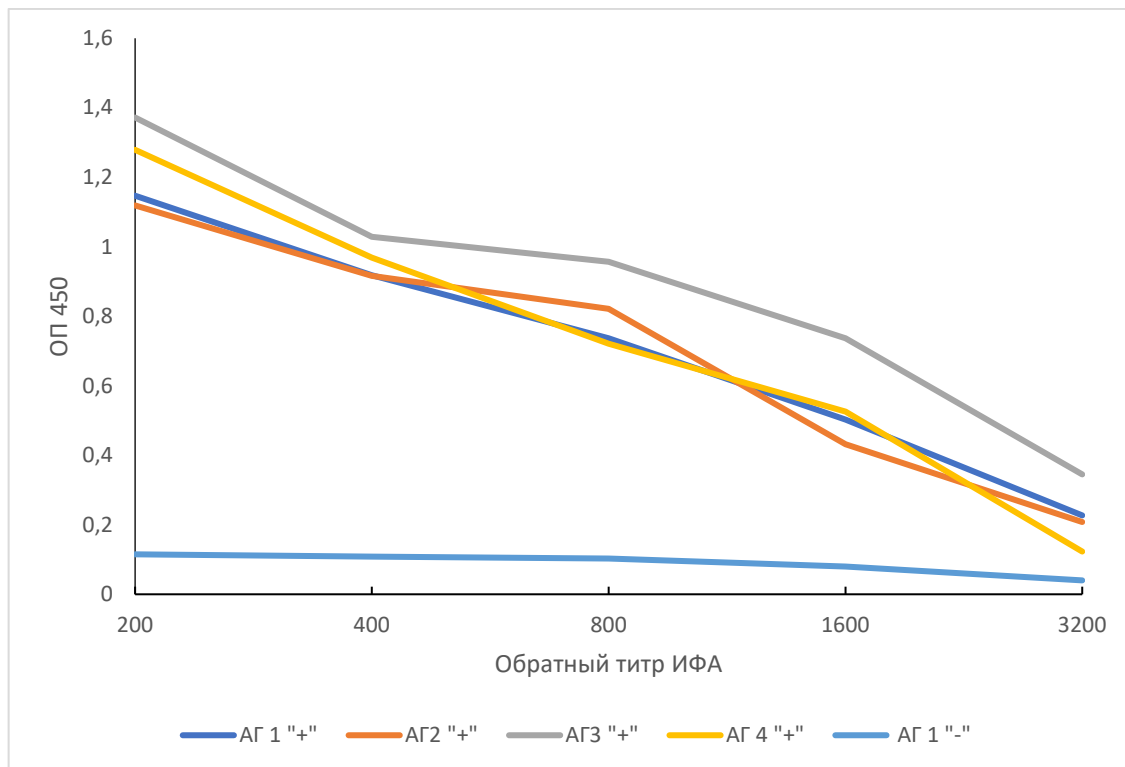
Для определения концентрации recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости в процессе получения белков к культуре клеток насекомых были построены калибровочные кривые зависимости ОП₄₅₀ от концентрации белка в растворе, рисунок 21.

Зависимость оптической плотности препаратов recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в ИФА от их концентрации по общему белку мкг/мл



Для оценки возможности применения разработанной тест-системы (АГ-ВГБК) для выявления вируса ГБК в патологическом материале, были исследованы гомогенаты печени здоровых кроликов и кроликов, павших после заражения вирулентными штаммами вируса ГБК генотипов 1 и 2. До исследования в ИФА, все пробы патологического материала проверяли на наличие гемагглютинирующего агента в РГА с эритроцитами человека и на наличие РНК вируса ГБК в ПЦР. Результаты титрования представлены на рисунке 22.

Результаты титрования образцов патологического материала при проведении ИФА



С помощью, разработанной тест-системы (АГ-ВГБК), были проведены исследования образцов патологического материала, полученных от павших и больных животных, результаты представлены в таблице 13.

Результаты исследования полевых образцов патологического материала кроликов

№ кролика	Титр в ИФА и интерпретация результата				Титр в РГА и интерпретация результата		Результат ПЦР
	Разработанная тест-система		INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.2				
1	1:400	+	1:400	+	1:256	+	+
2	< 1:100	-	< 1:100	-	1:16	-	-
3	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
4	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
5	1:200	+	1:400	+	1:128	+	+
6	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
7	1:800	+	1:800	+	1:512	+	+
8	1:800	+	1:800	+	1:512	+	+
9	1:400	+	1:400	+	1:128	+	+
10	1:800	+	1:800	+	1:512	+	+
11	1:800	+	1:800	+	1:512	+	+
12	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
13	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
14	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
15	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
16	<1:400	+	1:400	+	1:256	+	+
17	1:400	+	1:200	+	1:256	+	+
18	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
19	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
20	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
21	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
22	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
23	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
24	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
25	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
26	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
27	< 1:100	-	< 1:100	-	< 1:2	-	-
28	1:400	+	1:400	+	1:256	+	+
29	1:400	+	1:400	+	1:128	+	+
30	1:200	+	1:200	+	1:128	+	+

Примечание: «+» и «-» – положительный и отрицательный результат реакции соответственно.

В 12-ти пробах в ИФА был обнаружен АГ вируса ГБК в титрах от 1:200 до 1:800, во всех этих пробах так же был обнаружен гемагглютинирующий агент в титрах от 1:128 до 1:512, а в ПЦР была обнаружена РНК вируса ГБК.

В 18-ти пробах АГ вируса ГБК обнаружено не было, а результаты ПЦР были отрицательными, при этом титр гемагглютинаина в 17-ти составил менее 1:8. В одной пробе титр в РГА был 1:16.

Результаты, полученные в разработанной тест-системе (АГ-ВГБК), не отличались от результатов, полученных в INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 («Ingenaza», Испания).

Таблица 14.

Сравнительная оценка результатов в разработанной тест-системе (АГ-ВГБК) и INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 («Ingenaza», Испания)

		Результат, при проведении ИФА INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 («Ingenaza», Испания)	
		Количество положительных проб (n=12)	Количество отрицательных проб (n=18)
Результаты в разработанной тест-системе (АГ-ВГБК), количество проб:	положительных	12	0
	отрицательных	0	18

Результаты, приведенные в таблице 14, свидетельствуют о том, что диагностическая чувствительность разработанной тест-системы (АГ-ВГБК) по отношению к тест-системе INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 («Ingenaza», Испания) составила:

- чувствительность $\frac{12}{12} \times 100 = 100\%$;
- диагностическая специфичность $\frac{18}{18} \times 100 = 100\%$;
- совпадаемость результатов двух методов $-\frac{12+18}{(12+0)+(18+0)} \times 100 = 100\%$.

5. Обсуждение

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов – это инфекционное, высококонтагиозное заболевание, вызываемое вирусом из рода *Lagovirus* семейства *Caliciviridae*.

Патогенные лаговирuses из геногрупп GI.1 и GI.2, наносящие огромный экономический ущерб кролиководству, циркулируют повсеместно, в том числе и на территории РФ [8, 12, 38].

Всё большую роль в патологии кроликов приобретают вирусы ГБК 2-го генотипа, которые с момента обнаружения в 2010 году во Франции «вытесняют» вирусы ГБК 1-го генотипа по всему миру. Основными отличительными чертами вируса ГБК 2-го генотипа является его способность к инфицированию не только кроликов, но и зайцев, поражение молодых крольчат и частое протекание болезни в подострой форме. Особо стоит отметить слабую перекрестную защиту от инфицирования кроликов, иммунизированных вакцинами против ВГБК, изготовленных на основе штаммов вируса ГБК 1-го генотипа, при инфицировании лаговирusesами 2-го генотипа [58].

В 2019 году от погибших в Тульской области кроликов был выделен вирулентный штамм вируса ГБК 2-го генотипа. В результате проведенных исследований была определена полная нуклеотидная последовательность и проведен филогенетический анализ генома штамма «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа, который показал его схожесть с вирусами ГБК из Европы и США, выделенными в период 2016–2020 годов.

В данной работе описано получение в бакуловирусной системе экспрессии генов и исследование биологических свойств рекомбинантных главных капсидных белков, кодируемых ORF-1, вирусов ГБК геногрупп 1 и 2 (*recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2*), с целью их дальнейшего применения в качестве реагентов в ИФА тест-системах для выявления АТ к вирусу ГБК и антигенов в патологическом материале.

Проблема изучения лаговирuсов, изготовления диагностических и профилактических препаратов связана с отсутствием репликации лаговирuсов в культурах клеток. Получение вирусных антигенов возможно только с использованием инфицированного патологического материала (суспензия печени), полученного от зараженных кроликов, что связано с необходимостью соблюдения строгих мер биобезопасности и биоэтики.

Первый этап наших исследований был посвящён получению рекомбинантных главных капсидных белков (VP60) вируса ГБК в бакуловирусной системе экспрессии генов. VP60 является основным белком капсида лаговирuсов, который отвечает за гемагглютинирующую активность, биологические и иммунологические свойства вируса ГБК, в том числе и за выработку протективных антител.

Бакуловирусная система экспрессии генов является эффективным методом получения как рекомбинантных вирусных белков в общем [3, 15, 18] так и VP60 вируса ГБК, в частности.

Основными преимуществами бакуловирусной системы экспрессии являются высокий синтез рекомбинантных белков и отсутствие репликации бакуловируса в клетках млекопитающих, в том числе кролика, а также относительная простота обусловили выбор бакуловирусной системы для получения *recVP60*.

При конструировании рекомбинантных векторов, ORF-1 были амплифицированы с вирусных РНК штаммов вирусом гемморагической болезни кроликов «Воронежский-87» (генотип GI.1) и «Тула» (генотип GI.2).

Для химической трансфекции и наработки рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-GI.1 и AcORF-1-GI.2 применяли культуру клеток насекомых Sf-9, а для получения *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2* использовали культуру клеток насекомых Hi-5, так же, как и другие авторы [47, 176, 91].

При этом накопление рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-GI.1 и AcORF-1-GI.2 в титрах $10^{5,0}$ - $10^{5,5}$ БОЕ₅₀/см³ наблюдали на 3-4-е сутки после ин-

фицирования культуры клеток Sf-9, а максимальное накопление антигенов происходило на 3-4-е сутки после заражения культуры клеток Hi-5 рекомбинантными бакуловирусами с множественностью 0,1 БОЕ₅₀/клетку, что соотносится с данными приведенными в статье многих авторов [98, 174].

Электрофорез в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг со специфическим конъюгатом после электрофоретического разделения показал наличие в очищенных пробах белков с молекулярной массой около 60 kDa, что соответствует, молекулярным массам главных капсидных белков вируса ГБК [107, 140, 150].

Очищенные препараты recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 обладали гемагглютинирующей активностью в РГА с эритроцитами человека, что позволило предположить, что молекулы рекомбинантных VP60 образуют в 0,15 М растворе PBS ВПЧ. В дальнейшем электронная микроскопия подтвердила наше предположение – на электронных фотографиях наблюдали ВПЧ размером около 30 нм.

Капсид калицивирусов состоит из 90 дугообразных димеров белка капсида, которые образуют 32 чашеобразных углубления, и имеет диаметр 35–39 нм. Подобные результаты были получены рядом исследователей [23, 183].

Изучение антигенной активности полученных recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 для кроликов показало, что введение белков кроликам вызывает синтез специфических антител. Для детекции антител использовали ИФА и РТГА. В качестве гемагглютинирующих антигенов в РТГА использовали 8 ГАЕ recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 и нативные (10% гомогенат печени кролика) вирусы ГБК штамм «Воронежский-87» 1-го генотипа и штамм «Тула» 2-го генотипа. В работе использовали серонегативных в отношении вируса ГБК животных.

В ИФА за отрицательный результат принимали уровень антител <1:200, т.к. минимальное разведение сыворотки крови, используемое в тест-системе ИФА, 1:200. Учитывая, что в сыворотке крови кроликов содержатся неспецифические антигемагглютинины, торможение агглютинации в разведение 1:40 и ниже принимали за неспецифическое, а сыворотки с тиром в РТГА <1:40 считали отрицательными. На 21 сутки после иммунизации кроликов 50 мкг рекомбинант-

ных капсидных белков однократно у всех отмечался синтез специфических антител к главным капсидным белкам вируса ГБК в титрах 1:400-1:800 ($8,64 - 9,64 \log_2$) и 1:1280-1:2560 ($10,32-11,32 \log_2$) в ИФА и РТГА соответственно.

Наличие антигенных свойств у *gесVP60-GI.1* и *gесVP60-GI.2* открывает перспективы использования их в качестве компонентов диагностических систем, направленных на выявление у кроликов АТ к вирусу ГБК и препаратов для специфической профилактики болезни у кроликов. На их основе возможна разработка сэндвич-ИФА и их можно использовать в качестве АГ в РТГА.

Проведенные исследования, показали положительную корреляцию между титрами антител к вирусу ГБК выявляемых методами ИФА и РТГА в сыворотках крови кроликов ($r=0,80$; $p<0,05$). Установлена прямая зависимость между уровнем специфических антител, выявляемым обоими методами – все отрицательные в РТГА сыворотки были отрицательными и в ИФА, а при увеличении титра в РТГА происходило увеличение титра и в ИФА. Таким образом, оба метода могут успешно применяться для выявления антител к вирусу ГБК.

Учитывая разницу в перекрестной защите животных, иммунизированных вакцинами против ВГБК, которые изготавливаются на основе штаммов вируса ГБК одного генотипа, при заражении штаммами вируса ГБК другого генотипа, были проведены исследования антигенного родства полученных *gесVP60* между собой и с вирусами ГБК 1-го и 2-го генотипов с помощью РТГА. Полученные результаты подтвердили дифференциальные антигенные свойства, проявляемые капсидными белками вируса ГБК 1-го и вируса ГБК 2-го генотипов.

Антигенное родство между *gесVP60-GI.1* и *gесVP60-GI.2*, так же, как и между штаммами вирусов ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» и 2-го генотипа «Тула», в РТГА составило 73%. При этом антигенное родство между *gесVP60-GI.1* и шт. вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» и между *gесVP60-GI.2* и шт. вируса ГБК 2-го генотипа «Тула» составило 99% и 97%.

Степень антигенного родства между *gесVP60-GI.1* и шт. вируса ГБК 2-го генотипа «Тула» составила 72%, а между *gесVP60-GI.2* и шт. вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» 74%.

Согласно J. Brooksby [4] штаммы, имеющие степень родства 70% и более, относятся к одному антигенному варианту; 32–70% – к разным антигенным вариантам; 10–32% – к сильно отличающимся антигенным вариантам; менее 5% – к разным типам.

Анализ данных, показал, что полученные рекомбинантные главные капсидные белки вируса ГБК и вирулентные штаммы вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» и 2-го генотипа «Тула» принадлежат к одному антигенному варианту, но как вирусы разных генотипов, так и рекомбинантные белки, полученные на их основе, отличаются между собой по антигенным свойствам.

Дальнейшие исследования иммуногенной активности гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 подтвердили важность этих различий.

После контрольного заражения вирулентным штаммом «Воронежский-87» вируса ГБК 1-го генотипа выжили все животные, иммунизированные гесVP60-GI.1 и 80 % кроликов, которым вводили смесь гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2. Значение иммуногенной активности гесVP60-GI.2 составило 20%, а в контрольной группе 100 % летальность.

После контрольного заражения вирулентным штаммом «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа выжили все кролики, иммунизированные гесVP60-GI.2 и смесью гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2, а иммуногенная активность гесVP60-GI.1 составила 20%. В контрольной группе фиксировалась 100 % летальность.

Результаты контрольного заражения доказали различия в иммуногенности полученных рекомбинантных белков при заражении вирусами разных генотипов. Иммуногенная активность против гетерологичного вируса не превышала 20%, тогда как при использовании вируса такого же генотипа, или в случае иммунизации кроликов смесью рекомбинантных белков, иммуногенная активность была 80-100% [13]. Данные результаты хорошо соотносятся с ранее известным феноменом: ограниченной защитой кроликов, вакцинированных вакцинами против ВГБК, изготовленных на основе штаммов 1-го генотипа, при заражении лаговирuсами 2-го генотипа [161].

Проводимые серологические исследования показали, что выжившие кролики имели до контрольного заражения уровень АТ к вирусу ГБК 1:400 и 1:640 и выше в ИФА и РТГА соответственно.

Высокая иммуногенная активность, полученных гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 позволяет рассматривать их как возможные компоненты при разработке препаратов для специфической профилактики ВГБК.

Иммуногенная активность рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК была показана рядом авторов, а вакцины на их основе формировали у кроликов надежную защиту [84, 149, 187]. Для продукции белков использовали *Escherichia coli* [36], клетки растений [45, 67, 80, 129, 142] и рекомбинантные бакуловирусы с экспрессией в клетках насекомых [84, 103, 124, 150, 165] или в личинках насекомых [163]. Существует вакцина на основе рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего капсидный белок вируса ГБК.

Для выявления специфических антител к вирусу ГБК в диагностических целях используются РТГА и ИФА. Несмотря на свою простоту, РТГА часто дает ложноотрицательные или ложноположительные результаты, а нормальные сыворотки кроликов содержат неспецифические антигемагглютинины. Главным же ее недостатком является необходимость использования в качестве гемагглютинирующего антигена вирусосодержащей суспензии патологического материала от инфицированного кролика.

Проведенные исследования показывают, что в качестве гемагглютинирующего антигена в РТГА можно использовать гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2, однако применение ИФА на основе рекомбинантных белков с целью выявления АТ к вирусу ГБК выглядит более перспективно.

Применение гесVP60 в диагностических тестах описано рядом авторов [44, 99, 105, 164, 171]. Опираясь на опыт авторов, была разработана тест-система в формате сэндвич-ИФА, для выявления АТ к вирусу ГБК у кроликов. Особенностью разработанной тест-системы является использование в качестве «подложки» смеси рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК двух генотипов, что позволило увеличить чувствительность системы для выявления антител к главному капсидному белку вируса ГБК независимо от генотипа вируса.

Несмотря на антигенное родство между лаговиррусами 1-го и 2-го генотипа, были отмечены различия в чувствительности как РТГА, так и ИФА, где в качестве гемагглютинирующего АГ или подложки использовали антиген одного генотипа при выявлении АТ к вирусу другого генотипа.

Титрование положительных к recVP60-GI.1, recVP60-GI.2 и отрицательных сывороток крови кроликов на подложках, содержащих рекомбинантные белки или их смесь в соотношении 1:1 в концентрации 10 мкг/лунку показало, что использование смеси recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 позволяет сохранить чувствительность системы для выявления антител к главному капсидному белку вируса ГБК независимо от генотипа вируса.

Сравнение разработанной тест-системы (АТ-ВГБК) с коммерческим набором INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.1 («Ingenaza», Испания) показало высокую корреляцию результатов, полученных в двух системах ($r=0,97$; $p<0,05$), причем чувствительность разработанной тест-системы была выше при исследовании сывороток крови кроликов содержащих антитела к вирусу ГБК 2-го генотипа. Обе тест-системы обладали высокой специфичностью.

Наличие положительной корреляции между уровнем АТ к вирусу ГБК, получаемых при проведении ИФА, и способностью кроликов выживать при контрольном заражении вирулентными штаммами лаговирусов, позволяет использовать разработанную тест-систему (АТ-ВГБК) для оценки поствакцинального гуморального иммунитета у кроликов. С этой целью было исследовано 30 сывороток крови, полученных от кроликов, содержащихся в кролиководческом хозяйстве и привитых коммерческой вакциной от вируса ГБК согласно рекомендациям производителя.

Исследование парных сывороток кроликов, взятых до вакцинации и через 21 день после введения вакцины, показало выраженную сероконверсию у кроликов после введения вакцины, выявленную в ИФА.

Для индикации и идентификации вируса ГБК в патологическом материале от кроликов применяется ИФА или РГА, с последующим подтверждением

природы гемагглютинирующего агента в РТГА со специфической сывороткой. Для выявления его РНК существуют различные варианты ПЦР.

Однако наиболее простым и доступным методом лабораторной диагностики вируса ГБК, на наш взгляд, является ИФА. Это простой, быстрый и доступный метод позволяющий обнаружить вирус в патологическом материале [99]. Кроме того, с помощью ИФА можно определять концентрацию рекомбинантных VP60 в культуральной жидкости в процессе их наработки.

На основе полученных ресVP60-GI.1 и ресVP60-GI.2 в АНО «НИИДПБ» были получены моноклональные АТ к главным капсидным белкам вируса ГБК.

Используя очищенные ресVP60-GI.1 и ресVP60-GI.2 и 10% гомогенаты печени здоровых кроликов и кроликов, павших после заражения вирулентными штаммами вируса ГБК генотипов 1 и 2, была подобрана пара мАТ и разработана тест-система ИФА (АГ-ВГБК) для выявления вируса ГБК в патологическом материале и рекомбинантных белков в культуральной жидкости.

Для оценки возможности применения разработанной тест-системы (АГ-ВГБК) для выявления вируса ГБК в патологическом материале, были исследованы 30 полевых проб печени кроликов.

В 12-ти пробах в ИФА был обнаружен АГ вируса ГБК в титрах от 1:200 до 1:800, во всех этих пробах так же был обнаружен гемагглютинирующий агент в титрах от 1:128 до 1:512, а в ПЦР была обнаружена РНК вируса ГБК.

В 18-ти пробах АГ вируса ГБК обнаружено не было, а результаты ПЦР были отрицательными, при этом титр гемагглютинина в 17-ти составил менее 1:8. В одной пробе титр в РГА был 1:16.

Таким образом, результаты, полученные в разработанной тест-системе (АГ-ВГБК), в 100% случаев совпали с результатами ПЦР. В РГА во всех положительных в ИФА и ПЦР пробах был обнаружен гемагглютинирующий агент. Наличие гемагглютинации в пробах гомогената печени от здоровых животных свидетельствует о возможности ложноположительных результатах при использовании РГА для диагностических исследований и необходимости дополнительной постановки РТГА со специфической в отношении вируса ГБК сывороткой для подтверждения природы гемагглютинина.

Диагностическая чувствительность, специфичность и совпадаемость результатов разработанной тест-системы (АГ-ВГБК) по отношению к тест-системе INGEZIM RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 («Ingenaza», Испания) составила 100%.

Очищенные растворы recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 с концентрациями по белку от 50 до 0,01 мкг/мл исследовали в ИФА. Установлена прямая зависимость ОП₄₅₀ пробы от концентрации белка в растворе для концентраций белка 1,5 до 0,02 мкг/мл. Таким образом, используя калибровочную кривую, можно определять содержание рекомбинантных главных капсидных в культуральной жидкости в процессе получения продукта. Чувствительность ИФА в таком случае составляет 0,02 мкг/см³.

6. Заключение

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов, вызываемая лаговирусами генотипов GI.1 и GI.2, распространена по всему миру, включая территорию РФ. Вирусы этих генотипов отличаются по своим биологическим свойствам, в том числе по возрасту и видам инфицируемых животных, формой протекания заболевания. На данный момент наблюдается «вытеснение» штаммов вируса ГБК 1-го генотипа штаммами генотипа GI.2, который нам удалось идентифицировать и охарактеризовать. В дальнейшем была построена филогенетическая дендрограмма вируса ГБК 2-го типа шт. «Тула», по которой видно, что наиболее близкими к нему оказались последовательности вирусов из Польши, США и Франции, которые были выделены в период 2016–2020 годов [12].

Передача вируса происходит путем прямого контакта с инфицированными животными через оральный, назальный или конъюнктивальный пути. Учитывая высокую контагиозность и патогенность вирусов ГБК, необходимо наличие современных средств лабораторной диагностики заболевания.

Одними из самых распространенных методов диагностики вируса ГБК являются РГА и РТГА, ИФА и обнаружение РНК вируса при помощи ПЦР.

Главный капсидный белок VP60 обуславливает иммунобиологические свойства лаговирусов, в том числе вызывает у кроликов образование антител, выявляемых в РТГА и ИФА.

Вирусы ГБК не удается культивировать в культуре клеток, в связи с чем, в качестве компонентов диагностических тест-систем и вакцин используется вирусный антиген в виде гомогената тканей кроликов, которые были инфицированы вирулентными штаммами вируса ГБК. Такой метод получения вируса является биологически опасным и негуманным по отношению к животным. Использование *recVP60* в качестве компонентов диагностических и профилактических препаратов позволяет избежать таких проблем - *recVP60* обладают выраженной антигенной активностью [74].

Полученные в бакуловирусной системе экспрессии *recVP60*, способны самособираются в вирусоподобные частицы. ВПЧ – это частицы напоминающие вирусный капсид и содержащие антигенные детерминанты вируса, которые не содержат нуклеиновой кислоты, поэтому они не способны инфицировать клетки человека и животных, что обеспечивает их безопасность [6].

ВПЧ образуются из вирусных белков, полученных путем очистки и фракционирования вирусных частиц, а также из рекомбинантных белков, полученных в различных системах экспрессии [132, 190, 199].

Бакуловирусная система экспрессии является лучшей для продукции рекомбинантных белков с целью получения ВПЧ [92, 131, 137, 189]. ВПЧ, полученные в этой системе, обладают биологическими свойствами характерными для вирусных частиц [178]. Было показано, что ВПЧ вируса ГБК индуцируют полную защиту кроликов от заболевания [56, 150].

В результате проведенной работы были получены рекомбинантные бакуловирусы, кодирующие гены главных капсидных белков вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2. Была разработана технология получения указанных белков, включая оптимизацию процесса культивирования культур клеток насекомых, подбор заражающей дозы рекомбинантных бакуловирусов для культур клеток, продолжительность культивирования и процесса очистки продуктов экспрессии.

Результаты изучения антигенной и иммуногенной активности *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2* позволили использовать полученные белки и моноклональные антитела к ним в качестве компонентов ИФА тест-систем.

recVP60-GI.1 и *recVP60-GI.2* были использованы в качестве реагентов в

тест-системе ИФА (АТ-ВГБК) для выявления АТ к вирусу ГБК, которую сравнивали с коммерческой тест-системой ИФА и РТГА, при этом была установлена положительная корреляция результатов, полученных всеми методами исследования сывороток крови кроликов. Результатами исследования стала разработка набора ИФА (АТ-ВГБК) для выявления антител к вирусу ГБК в сыворотке крови (Приложение №1).

Полученные *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2* были использованы в АНО «НИИДПБ» для получения моноклональных АТ к главным капсидным белкам вируса ГБК, что позволило в дальнейшем разработать тест-систему (АГ-ВГБК) для обнаружения антигенов ГБК в патологическом материале и культуральной жидкости в процессе получения рекомбинантные главных капсидных белков вируса ГБК. По результатам исследований были разработаны МУК Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в патологическом материале методом сэндвич-ИФА ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (Приложение №2).

7. Выводы:

1. Филогенетический анализ генома штамма «Тула» вируса ГБК показал его принадлежность к геногруппе GI.2 и высокую степень гомологии с изолятами выделенными в период 2016–2020 годов на территории Европы и США.
2. Получены рекомбинантные вирусы ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographa californica* (*AcNPV*) со вставкой ORF-1 вируса ГБК генотипа GI.1 (*AcORF-1- GI.1*) и генотипа GI.2 (*AcORF-1- GI.2*).
3. Получены очищенные препараты *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2*, которые в PBS с pH 7,2-7,4 обладают гемагглютинирующей активностью и формируют ВПЧ размером 15-30 нм.
4. Установлено, что *recVP60-GI.1* и *recVP60-GI.2* обладают антигенной активностью. На 21 сутки после однократного введения 50 мкг белков у иммунизированных кроликов титр специфических антител составил 1:400-1:800 (8,64-9,64 log₂) и 1:1280-1:2560 (10,32-11,32 log₂) в ИФА и РТГА соответственно, а защитным титром специфических АТ к вирусу ГБК является 1:400 и 1:640 в ИФА и РТГА соответственно.

5. Показано, что recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 обладают иммуногенной активностью для кроликов на уровне 80-100% при контрольном заражении вирусом такого же генотипа, иммуногенная активность при контрольном заражении гетерологичным вирусом не превышает 20%.

6. На основе recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 разработана тест-система (АТ-ВГБК) в формате «непрямого» ИФА для выявления антител к вирусу ГБК, с чувствительностью и специфичностью 98% и 96,6% соответственно по сравнению с прототипной тест-системой ИФА.

7. На основе МАТ к recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 разработана тест-система (АГ-ВГБК) в формате сэндвич-ИФА для обнаружения антигенов вируса ГБК в патологическом материале, с чувствительностью и специфичностью 100% и 100% соответственно по сравнению с прототипной тест-системой ИФА, и для определения концентрации recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости в процессе наработки белков, с чувствительностью 0,02 мкг\мл.

8. Практические предложения

На основе полученных результатов разработаны:

- СТО 00496165-0002-2021 Набор для иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу геморрагической болезни кроликов в сыворотке крови.

- Методические указания Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в патологическом материале методом сэндвич-ИФА ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

9. Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 обладают выраженной иммуногенной активностью для кроликов при контрольном заражении вирулентными штаммами вируса ГБК, что указывает на возможность их применения в составе вакцин для специфической профилактики ВГБК.

Разработанные тест-системы рекомендуются к применению для иммунодиагностики ВГБК.

10. Список сокращений

ВГБК- вирусная геморрагическая болезнь кроликов

recVP60- рекомбинантные главные капсидные белки VP60

Sf-9- Spodoptera frugiperda

Hi-5- High Five cells

РНК-рибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

мкг – микрограмм

мкл – микролитр

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

нм – нанометр

kDa-килодальтон

rec- рекомбинантный

GI.1- вирус, относящийся к первому генотипу вируса ГБК

GI.2 - вирус, относящийся ко второму генотипу вируса ГБК

МЭБ – международное эпизоотическое бюро

ОТ- ПЦР - ПЦР с обратной транскрипцией

IgG- иммуноглобулин G

ВПЧ – вирусоподобные частицы

g- гуанин

c- цитозин

t- тиамин

a- аденин

ORF- открытая рамка считывания

AcNPV - вирус ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographa californica*

ФБР - фосфатно-буферный раствор

АТ - антитело

АГ - антиген

мАТ - моноклональные антитела

ФСБТ – фосфатно-буферный раствор для промывания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РГА – реакция гемагглютинации

РТГА- реакция торможения гемагглютинации

11. Список использованной литературы

1. Алексеев, К. П. Получение рекомбинантного капсидного белка VP60 вируса геморрагической болезни кроликов и изучение его антигенной и иммуногенной активности / Алексеев К.П., Москвина А.С., Верховский О.А., Селезнева Е.В., Черных О.Ю., Мухин А.Н. // Ветеринария кубани. — 2020. — № 5. — С. 34-37.
2. Барышников, П. И. Ветеринарная вирусология: Учебное пособие / П.И. Барышников. // Барнаул: Издательство АГАУ—2006. — 93 с.
3. Белжеларская, С. Н. Бакуловирусные системы экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых и млекопитающих / С. Н. Белжеларская // Молекулярная биология. — 2011. — № 45 (1). — С. 142–159.
4. Бурдов, А. Н. Ящур/ А.Н. Бурдов, А. И. Дудников, П.В. Малярец и др// монография -М.: Агропромиздат - 2090. – 320 с.
5. Бурмакина, Г. С. Идентификация Генома Вируса Геморрагической Болезни Кроликов Методом ПЦР// Г.С. Бурмакина, А.С. Малоголовкин, А. В. Николаев, А. В. Луницин, С. Ж. Цыбанов // Российский Ветеринарный Журнал. Сельскохозяйственные Животные — 2012. — №1. — С. 35-37.
6. Васильев, Ю. М Вакцины против вируса гриппа птиц / Ю. М Васильев // Вопросы вирусологии. — 2008. — № Т. 6. № 1. — С. 4-15.
7. Власов, Н. А. Физико-химические свойства и антигенная структура вируса геморрагической болезни кроликов: специальность 03.00.06 «Вирусология»: Диссертация на соискание доктора биологических наук / Власов Н.А. — Покров —1998. — 347 с.
8. Власова, Н. Н. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов / Н. Н. Власова, О.А. Верховский, Л.С. Блинова, Т.И. Алипер, Д.К. Львов // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных — 2013. — С. 987 – 989.

9. Ездакова, И. Ю. Использование моноклональных антител для оценки В-клеточного звена иммунитета крупного и мелкого рогатого скота / И. Ю. Ездакова, О. В. Капустина., С. В. Вальциферова, А. Г. Григорьев // Ветеринария и кормление. – 2022. – № 3. – С. 22-24.

10. Ездакова, И. Ю. Моноклональные антитела для определения растворимых и мембранных форм иммуноглобулинов крупного рогатого скота / И. Ю. Ездакова, И. С. Гончарова // Международный научно-исследовательский журнал. – 2014. – № 2-3(21). – С. 99-100.

11. Кольцов, А. Ю. Генетическая характеристика изолятов вируса геморрагической болезни кроликов, выделенных в России в 2018-2020 г.г / А. Ю. Кольцов, С. В. Белов, М. М. Сухер // Сборник тезисов докладов 20-й Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. — Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» — 2020. — С. 155-156.

12. Мухин, А. Н. Вспышка заболевания, вызванная вирусом геморрагической болезни кроликов 2-го генотипа на территории РФ / А. Н. Мухин, А. Г. Южаков, Е. В. Селезнева, Е. И. Дроздова, О. А. Верховский, Т. И. Алипер // Аграрная наука. — 2021. — № 4. — С. 25-27.

13. Мухин, А. Н. Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (Caliciviridae: Lagovirus) геногрупп GI1, GI2 / Мухин А.Н., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Селезнева Е.В., Москвина А.С., Верховский О.А., Алипер Т.И // Вопросы вирусологии. — 2023. — № 2. — С. 132-141.

14. Патент № 2009141090/10, 2009.11.09. Олигонуклеотидные праймеры, способ и тест-система для выявления генома вирусной геморрагической болезни кроликов методом обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции.: № 2009141090/10: заявл. 09.11.2009: опубл. 20.04.2011 / Бурмакина Г. С,

Жигалева О. Н, Малоголовкин А. С, Цыбанов С. Ж, Колбасов Д. В, Луницин А. В, Гузалова А. Г. — С. 11.

15. Раев, С. А. Получение рекомбинантного капсидного белка цирковируса свиней второго типа (генотип 2b) в бакуловирусной системе и использование его для изготовления вакцины / С. А. Раев, К. П. Алексеев, Е. В. Шемельков, А. Д. Булгаков, М. И. Мусиенко, Б. Г. Орлянкин, О. А. Верховский, Т. И. Алипер // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. — 2012. — № 3. — С. 17-19.

16. Сергеев, В. А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер. – М.: Библионика – 2007. — С. 466.

17. Сюрин, В. Н. Вирусные болезни животных. / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко — М: ВНИИТИБП. — 1998. — С. 485.

18. Хасанов, Ш. Ш. Бакуловирусная система экспрессии, как безопасная и эффективная система для получения рекомбинантных белков / Ш. Ш. Хасанов, С. А. Сасмаков, Ж. М. Абдурахманов, О. Н. Аширов, Ш. С. Азимова // *Universum: химия и биология*. — 2019. — № 6 (60). — С. 13-16.

19. Шевченко, А. А. Специфическая профилактика инфекционных болезней кроликов: вирусной геморрагической болезни, миксоматоза и пастереллеза: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология»: Диссертация на соискание доктора биологических наук / А. А. Шевченко — Покров, 1994. — 285 с.

20. Шевченко, А. А., Вирусная геморрагическая болезнь кроликов // А.А. Шевченко, И.Ф. Вишняков, И.А. Бакулов и др// *Ветеринария*. — 1994. — № 10. — С. 22–23

21. Abrantes, J. Recombination at the emergence of the pathogenic rabbit haemorrhagic disease virus *Lagovirus europaeus*/GI.2 / J. Abrantes, C. Droillard, A.M. Lopes, E. Lemaitre, P. Lucas, Y. Blanchard, S. Marchandeaу, J. Pedro, Esteves & Ghislaine Le Gall-Reculé // *Scientific Reports*. — 2020. — V. 10. — Article number: 14502.

22. Abrantes, J. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013 / J. Abrantes, A. M Lopes, K. P. Dalton, P. Melo, J. J. Correia, M. Ramada, P. C. Alves, F. Parra, P. J. Esteves // *Emerg Infect Dis.* — 2013. — V. 19. — P. 1900–1902.
23. Abrantes, J. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review / J. Abrantes, van der Loo W, J. Le Pendu, P. J. Esteves // *Vet Res.* — 2012. — V. 43:12.
24. Abrantes, J. Detection of RHDVa on the Iberian Peninsula: Isolation on an RHDVa strain from a Spanish rabbitry / J. Abrantes, A. M Lopes, K. P Dalton, F. F Parra, P. J. Esteves // *Arch. Virol.* — 2014. — V. 159. — P. 321–326.
25. Ahmad, S.T. Immunological and virological studies on rabbit hemorrhagic disease virus. / S. T Ahmad, H. A. El-Samadony, K. M Mahgoub // *Glob. Vet.* — 2011. — V. 7. — P. 545–556.
26. Alda, F. Evolutionary history and molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the Iberian Peninsula and Western Europe. / F. Alda, T Gaitero, M. Suárez, T. Merchán, G. Rocha, I. Doadrio // *BMC Evol. Biol.* — 2010. — V. 10. — P. 347.
27. Almeida, T. Tracking the evolution of the G1/RHDVb recombinant strains introduced from the Iberian Peninsula to the Azores islands, Portugal. / T. Almeida, A. M. Lopes, M. J. Magalhaes, F. Neves, A. Pinheiro, D. Goncalves, M. Leitao, P. J. Esteves, J. Abrantes // *Infect Genet Evol.* — 2015. — V. 34. — P. 307–313.
28. Alonso, C. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. / C. Alonso, J. M. Oviedo, J. M. Martin-Alonso, E. Diaz, J. A. Boga, F. Parra // *Arch Virol.* — 1998. — V. 143. — P. 321-332.
29. Asgari, S. Field evidence for mechanical transmission of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by flies (Diptera: Calliphoridae) among wild rabbits in Australia. / S. Asgari, J. R. Hardy, R. G. Sinclair, B. D. Cooke // *Virus Res.* — 1998. — V. 54. — P. 123–132.

30. Baily, J.L. RHDV variant two presences detected in Scotland. / J. L. Baily, M. P. Dagleish, M. Graham, M. Maley, M. S. Rocchi // *Vet Rec.* — 2014. — V. 174. — P. 411.
31. Baratelli, M. Characterization of the maternally derived antibody immunity against RHDV-2 after administration in breeding does of an inactivated vaccine. / M. Baratelli, J. Molist-Badiola, A. Puigredon-Fontanet, M. Pascual, O. Boix, F. X. Mora-Igual, M. Woodward, A. Lavazza, L. Capucci, // *Vaccines.* — 2020. — V. 8. — P. 484.
32. Bebnowska, D. Characteristics of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus—RHDV2. / D. Bebnowska, P. Niedźwiedzka-Rystwej // *Acta Biol.* — 2019. — V. 15. — P. 83–97.
33. Bellier, B. DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. / B. Bellier, C. Dalba, B. Clerc, D. Desjardins, R. Drury, F. L. Cosset, M. Collins, and D. Klatzmann. // *Vaccine.* — 2006. — V. 24. — P. 2643-2655.
34. Bergin, I. L. Novel calicivirus identified in rabbits, Michigan, USA. / I. L. Bergin, A. G. Wise, S. R. Bolin, T. P. Mullaney, M. Kiupel, & R. K. Maes // *Emerg Infect Dis.* — 2009. — V. 15. — P. 1955–1962.
35. Biermann, U. Rabbit hemorrhagic disease (RHD)-comparative diagnostic studies using the hemagglutination test and electron microscopy. / U. Biermann, W. Herbst, G. Fau-Baljer, G. Baljer // *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* — 1992. — V. 105. — P. 86–87.
36. Boga J.A. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89) / J. A. Boga, R. Casais, M. S. Marin, J. M., MartinAlonso, R. S. Carmenes, M. Prieto et al. // *J Gen Virol.* — 1994. — V. 75. — P. 2409-13.
37. Buczek, J. Viral haemorrhagic disease of rabbit. / J. Buczek, W. Deptuła, J. Piekarski // *Med Wet.* — 1991. — V. 47. — P. 447–450 (in Polish).

38. Burmakina, G. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus strains originating from outbreaks in the Russian Federation / G. Burmakina, N. Malogolovkina, A. Lunitsin, I. Titov, S. Tsybanov, A. Malogolovkin // *J. Virol* Received Jul. — 2016. — V. 161(7). — P. 1973-9.
39. Camarda, A. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*) / A. Camarda, N. Pugliese, P. Cavadini, E. Circella, L. Capucci, A. Caroli, M. Legretto, E. Mallia, A. Lavazza // *Res Vet Sci.* — 2014. — V. 97. — P. 642–645.
40. Capucci, L. Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2) / L. Capucci, P. Cavadini, M. Schiavitto, G. Lombardi, A. Lavazza // *Vet. Rec.* — 2017. — V. 180. — P. 426.
41. Capucci, L. A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: The appearance of the first consistent antigenic variant. / L. Capucci, F. Falacara, S. Grazioli, A. Lavazza, M. L. Pacciarini, E. Brocchi // *Virus Res.* — 1998. — V. 58. — P. 115–126.
42. Capucci, L. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. / L. Capucci, P. Fusi, A. Lavazza, M. L. Pacciarini, C. Rossi // *J. Virol.* — 1996. — V. 70. — P. 8614–8623.
43. Capucci, L. Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus / L. Capucci, A. Nardin, A. Lavazza // *Vet. Rec.* — 1997. — V. 140. — P. 647-650.
44. Capucci, L. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome / L. Capucci, M. T Sciclun, A. Lavazza // *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* — 1991. — V. 10. — P. 347–370.
45. Castanon, S. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. / S. Castanon, M.S. Marin, J. M. Martin-Alonso, J. A. Boga, R. Casais, J. M. Humara, R. J. Ordas, F. Parra // *J Virol.* — 1999. — V. 73. — P. 4452-4455.

46. Chackerian, B. Virus-like particles: Flexible platforms for vaccine development. / Chackerian B. // *Expert Rev. Vaccines*. — 2007. — V. 6. — P. 381–390.
47. Chambers, A. C. Overview of the Baculovirus Expression System. / A. C. Chambers, et al. // *Curr. Protoc. Protein Sci.* — 2018. — V. 91. — P. 5.4.1–5.4.6.
48. Chasey, D. Possible origin of rabbit haemorrhagic disease in the United Kingdom. / D. Chasey // *Vet. Rec.* — 1994. — V. 135. — P. 496–499.
49. Chasey, D. Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. / D. Chasey, M. H. Lucas, D. G Westcott, G. Sharp, A. Kitching, S. K. Hughes // *Vet. Rec.* — 1995. — V. 137. — P. 158–160.
50. Chen, S-Y. Hyperlipidemia in rabbit hemorrhagic disease. / S-Y. Chen, J-H. Shien, H-K. Ooi // *Exp Anim.* — 2008. — V. 57. — P. 479–483.
51. Collins, B. J. A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus / B. J. Collins, J. R. White, C. Lenghaus, V. Boyd, H.A. Westbury // *Vet. Microbiol.* — 1995. — V. 43. — P. 85–96.
52. Cooke, B. D. Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations / B. D. Cooke // *Rev Sci Tech.* — 2002. — V. 21. — P. 347–358.
53. Cooke, B. D. Rabbit haemorrhagic disease and the biological control of wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Australia and New Zealand. / D. Cooke, F. Fenner // *Wildl Res.* — 2002. — V. 29. — P. 689–706.
54. Cooke, B.D. Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia / B. D. Cooke, A. J. Robinson, J. C. Merchant, A. Nardin, L. Capucci // *Epidemiol Infect.* — 2000. — V. 124. — P. 563–576.
55. Cooke, B. D. Prior exposure to non-pathogenic calicivirus RCV-A1 reduces both infection rate and mortality from rabbit haemorrhagic disease in a population of wild rabbits in Australia. / B. D. Cooke, R. P. Duncan, I. McDonald, J. Liu, L. Capucci, G.J. Mutze, T. Strive // *Transbound. Emerg. Dis.* — 2018. — V. 65. — P. e470–e477.

56. Crisci, E. Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. / E. Crisci, J. Barcena, M. Montoya // *Vet Immunol Immunopathol.* — 2012. — V. 148. — P. 211–225.
57. Cubas, R. S. Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes. / R. S. Cubas, S. Zhang, E. M. Kwon, M. Sevick-Muraca, C. Li, Chen and Q. Yao. // *Journal of immunotherapy.* — 2009. — V. 32. — P. 118- 128.
58. Dalton, K.P. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula / K. P. Dalton, I. Nicieza, J. Abrantes, P. J. Esteves, F. Parra // *Vet. Microbiol.* — 2014. — V. 169. — P. 67-73.
59. Dalton, K. P. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain / K. P. Dalton, I. Nicieza, A. Balseiro, M. A. Muguerza, J. M. Rosell, R. Casais, Á. L. Álvarez, F. Parra // *Emerg. Infect. Dis.* — 2012. — V. 18. — P. 2009-2012.
60. Dalton, K. P Complete genome sequence of two rabbit hemorrhagic disease virus variant b isolates detected on the Iberian Peninsula. / K. P. Dalton, J. Abrantes, A. M. Lopes, I. Nicieza, A. L. Alvarez, P. J. Esteves, F. Parra // *Arch Virol.* — 2015. — V. 160. — P. 877–881.
61. Delibes-Mateos, M. Rabbits as a keystone species in southern Europe / M. Delibes-Mateos, S. M. Redpath, E. Angulo, P. Ferreras, R. Villafuerte // *Biol Conserv.* — 2007. — V. 137. — P. 149-156.
62. Deml, L. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: Potent stimulators of innate and acquired immune responses / L. Deml, C. Speth, M.P. Dierich, H. Wolf, R. Wagner // *Mol. Immunol.* — 2005. — V. 42. — P. 259–277.
63. Duarte, M. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains. / M. Duarte, C. Carvalho, S. Bernardo, S.V. Barros, S. Benevides, L. Flor, M. Monteiro, I. Marques, M. Henriques, S. C. Barros, T. Fagulha, F. Ramos, T. Luis, M. Fevereiro // *Infect Genet Evol.* — 2015. — V. 35. — P. 163–171.
64. Eden, J. S. Comparative phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus in Australia and New Zealand / J. S. Eden, J. Kovaliski, J. A Duckworth, G.

Swain, J. E. Mahar, T. Strive, E. C. Holmes // *J Virol.* — 2015. — V. 89. — P. 9548–9558.

65. Elsworth, P. G. Rabbit haemorrhagic disease: are Australian rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) evolving resistance to infection with Czech CAPM 351 RHDV / P. G. Elsworth, J. Kovaliski & B. D. Cooke // *Epidemiol Infect.* — 2012. — V. 140. — P. 1972–1981.

66. Esteves, P.J. The wide utility of rabbits as models of human diseases / P.J. Esteves, J. Abrantes, H. M. Baldauf, L. BenMohamed, Y. Chen, N. Christensen, J. González-Gallego, L. Giacani, J. Hu, G. Kaplan // *Exp. Mol. Med.* — 2018. — V. 50. — P. 1–10.

67. Fernandez-Fernandez, M.R. Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. / M. R. Fernandez-Fernandez, M. Mourino, J. Rivera, F. Rodriguez, J. Plana-Duran, J.A. Garcia // *Virology.* — 2001. — V. 280. — P. 283-291.

68. Ferreira, P. G. Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. / P. G. Ferreira, A. Costa-e-Silva, E. Monteiro, M. J. Oliveira, A. P. Aguas // *Res Vet Sci.* — 2004. — V. 76. — P. 83–94.

69. Ferreira, P. G. Liver enzymes and ultrastructure in rabbit haemorrhagic disease (RHD). / P. G. Ferreira, A. Costa-e-Silva, E. Monteiro, M. J. R. Oliveira, A. P. Aguas // *Vet Res Commun.* — 2006a. — V. 30. — P. 393–401.

70. Ferreira, P. G. Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. / P. G. Ferreira, A. Costa-e-Silva, M. J. R. Oliveira, E. Monteiro, E. M. Cunha, A.P. Aguas // *Res Vet Sci.* — 2006b. — V. 80. — P. 218–225.

71. Ferreira, P. G. Adult rabbits acquire resistance to lethal calicivirus infection by adoptive transfer of sera from infected young rabbits / P. G. Ferreira, M. Dinis, E. S. A. Costa, A. P. Aguas // *Vet Immunol Immunopathol.* — 2008. — V. 121. — P. 364-369.

72. Forrester, N. L. Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis / N. L. Forrester, B. Boag, S. R. Moss, S. L. Turner, R.C Trout, P. J. White, P.J Hudson, E.A. Gould // *J. Gen. Virol.* — 2003. — V. 84. — P. 3079–3086.
73. Forrester, N. L. Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. / N. L. Forrester, R. C. Trout, E. A. Gould // *Virology.* — 2007. — V. 358. — P. 18–22.
74. Frantz, F.G. Therapeutic DNA vaccine reduces schistosoma mansoni-induced tissue damage through cytokine balance and decreased migration of myofibroblasts / F. G. Frantz, T. Ito, K. A. Cavassani, C. M. Hogaboam, C. Lopes Silva, S. L. Kunkel, L. H. Faccioli // *Am. J. Pathol.* — 2011. — V. 179. — P. 223–229.
75. Frölich, K. Antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus in free-ranging red foxes from Germany. / K. Frölich, F. Klima, J. Dedek // *J. Wildl. Dis.* — 1998. — V. 34. — P. 436–442.
76. Gall, A. Persistence of viral RNA in rabbits, which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. / A. Gall, B. Hoffmann, J.P. Teifke, B. Lange, H. Schirrmeier // *Vet. Microbiol.* — 2007. — V. 120. — P. 17–32.
77. Garcia-Lastra, R. Signalling pathways involved in liver injury and regeneration in rabbit haemorrhagic disease, an animal model of virally induced fulminant hepatic failure. / R. Garcia-Lastra, B. San-Miguel, I. Crepsio, F. Jorquera, M. Alvarez, J. González-Gallego, M. Tunon // *Vet Res.* — 2010. — V. 41. — P. 2.
78. Gelmetti, D. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. / D. Gelmetti, V. Grieco, C. Rossi, L. Capucci, A. Lavazza // *J Virol Methods.* — 1998. — V. 72. — P. 219–226.
79. Gibb, J. A. The rabbit in New Zealand. In *The European Rabbit. The History and Biology of a Successful Colonizer.* (Eds H. V. Thompson and C. M. King.) / J. A. Gibb, and J. M. Williams // Oxford University Press. — 1994. — P. 158–204.

80. Gil, F. Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. / F. Gil, E. Titarenko, E. Terrada, E. Arcalis, J.M. Escribano // *Plant Biotechnol J.* — 2006. — V. 4. — P. 135-143.
81. Granzow, H. Hämorrhagische Septikämie der Kaninchen - Erregernachweis und erste elektronenmikroskopische Charakterisierung. / H. Granzow, H. Schirrmeier und H. Tews // *Mh.Vet.Med.* — 1989. — V. 4. — P. 379-380.
82. Gregg, D. A. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. / D. A. Gregg, C. House, R. Meyer, M. Berninger // *Rev Sci Tech.* — 1991. — V. 10. — P. 435-451.
83. Grgacic, E.V.L. Virus-like particles: Passport to immune recognition. / E.V.L. Grgacic, D.A. Anderson // *Methods.* — 2006. — V. 40. — P. 60–65.
84. Gromadzka, B. A Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. / B. Gromadzka, B. Szewczyk, G. Konopa, A. Fitzner, A. Keszy // *Acta biochimica Polonica.* — 2006. — V. 53. — P. 371-376.
85. Hall, R. N. Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. / R. N. Hall, D. E. Peacock, J. Kovaliski, J. E. Mahar, R. Mourant, M. Piper, T. Strive // *Vet Rec.* — 2017. — V. 180. — P. 121.
86. Henning, J. Survival of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in the environment. / J. Henning, J. Meers, P. R. Davies, R. S. Morris // *Epidemiol Infect.* — 2005. — V. 133. — P. 719-730.
87. Henning, J. Seropositivity to rabbit haemorrhagic disease virus in non-target mammals during periods of viral activity in a population of wild rabbits in New Zealand. / J. Henning, P.R Davies, J. Meers // *Wildl. Res.* — 2006. — V. 33. — P. 305–311.
88. Henning, J. Exposure of rabbits to ultraviolet light-inactivated rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) and subsequent challenge with virulent virus. / J. Henning, J. Meers, P.R. Davies // *Epidemiol. Infect.* — 2005. — V. 133. — P. 731–735.

89. Hu, Y. C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. / Y.C. Hu // *Acta Pharmacol Sin.* — 2005. — V. 26(4). — P. 405-16.
90. Hukowska-Szematowicz, B. Genetic and immunological characteristics of European strains of RHD (Rabbit Haemorrhagic Disease). / B. Hukowska-Szematowicz // *Pol J Env Stud.* — 2013. — V. 2. — P. 1–114.
91. Jarvis, D. L Baculovirus-insect cell expression systems. / D. L. Jarvis // *Methods Enzymol.* — 2009. — V. 463. — P. 191–222.
92. Johnson, J. E. & Chiu, W. Structures of virus and virus-like particles. / J. E. Johnson, & W. Chiu // *Curr Opin Struct Biol.* — 2000. — V. 10. — P. 229–235.
93. Jung, J. Y. Apoptosis in rabbit haemorrhagic disease. / J.Y. Jung, B.J. Lee, J.H. Tai, J.H. Park, Y.S. Lee // *J Comp Pathol.* — 2000. — V. 123. — P. 135-140.
94. Kerr, P. J. Origin and phylodynamics of rabbit hemorrhagic disease virus / P. J. Kerr, A. Kitchen, E. C. Holmes // *J Virol.* — 2009. — № 83. — P. 12129–12138.
95. Keszy, A. A new variant of the viral haemorrhagic disease of rabbit's virus. / A. Keszy, A. Fitzner, W. Niedbalski, G. Paprocka, B. Walkowiak // *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* — 1996. — V. 15. — P. 1029–1035.
96. Kimura, T. Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits. / T. Kimura, I. Mitsui, Y. Okada, T. Furuya, K. Ochiai, T. Umemura, C. Itakura // *J Comp Pathol.* — 2001. — V. 124. — P. 134-141.
97. Knight, K. L. Generating the antibody repertoire in rabbit. / K. L. Knight, M. A. Crane // *Adv. Immunol.* — 1994. — V. 56. — P. 179–218.
98. Korn, J. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. / J. Korn, D. Schäckermann, T. Kirmann et al. // *Sci Rep.* — 2020. — V. 10. — Article number: 21393.
99. Kovaliski, J. Monitoring the spread of rabbit hemorrhagic disease virus as a new biological agent for control of wild European rabbits in Australia / J. Kovaliski // *J. Wildl. Dis.* — 1998. — V. 34. — P. 421–428.

100. Kovaliski, J. Molecular epidemiology of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in Australia: when one became many / J. Kovaliski, R. Sinclair, G. Mutze, D. Peacock, T. Strive, J. Abrantes, P. J. Esteves & E. C. Holmes // *Mol Ecol.* — 2014. — V. 23. — P. 408–420.

101. Kushnir, N. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development / N. Kushnir, S. J. Streatfield, V. Yusibov // *Vaccine.* — 2012. — V. 31. — P. 58–83.

102. Kęsy, A. A new variant of the viral haemorrhagic disease of rabbit's virus. / A. Kęsy, A. Fitzner, W. Niedbalski, G. Paprocka, B. Walkowiak // *Rev Sci Tech.* — 1996. — V. 15. — P. 1029–1035.

103. Laurent, S. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. / S. Laurent, J. F. Vautherot, M. F. Madelaine, G. Le Gall, D. Rasschaert // *J Virol.* — 1994. — V. 68. — P. 6794-6798.

104. Lavazza, A. How Many Caliciviruses are there in Rabbits? A Review on RHDV and Correlated Viruses Lagomorph Biology. Edited by: P. C. Alves, N. Ferrand, K. Hackländer / A. Lavazza, L. Capucci // Springer Berlin Heidelberg — 2008. — P. 263-278.

105. Lavazza, A. Field and experimental data indicate that the eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) is susceptible to infection with European brown hare syndrome (EBHS) virus and not with rabbit haemorrhagic disease (RHD) virus. / A. Lavazza, P. Cavadini, I. Barbieri, P. Tizzani, A. Pinheiro, J. Abrantes, P.J. Esteves, G. Grilli, E. Gioia, M. Zanoni et al // *Vet. Res.* — 2015. — V. 46. — P. 13.

106. Le Gall, G. Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995 / G. Le Gall, C. Arnauld, E. Boilletot, J. P. Morisse, D. Rasschaert // *J Gen Virol.* — 1998. — V. 79. — P. 11-16.

107. Le Gall, G. Viral haemorrhagic disease of rabbit: purification and characterization of a strain isolated in France / G. Le Gall, E. Boilletot, J-P. Morisse // *Ann Rech Vet.* — 1992. — V. 23 — P. 381–387.

108. Le Gall-Recule, G. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus. / G. Le Gall-Recule, A. Lavazza, S. Marchandeu, S. Bertagnoli, F. Zwingelstein, P. Cavadini, N. Martinelli, G. Lombardi, J. L. Guerin, E. Lemaitre, A. Decors, S. Boucher, B. Le Normand, L. Capucci // *Vet Res.* — 2013. — V. 44. — P. 81.

109. Le Gall-Recule, G. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterization of RHDV antigenic variants / G. Le Gall-Recule, F. Zwingelstein, S. Laurent, C. de Boisseson, Y. Portejoie, D. Rasschaert // *Arch Virol.* — 2003. — V. 148. — P. 65–81.

110. Le Gall-Recule, G. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France / G. Le Gall-Recule, F. Zwingelstein, S. Boucher, B. Le Normand, G. Plassiart, Y. Portejoie, A. Decors, S. Bertagnoli, J.L. Guerin, S. Marchandeu // *Vet Rec.* — 2011. — V. 168. — P. 137–138.

111. Le Gall-Recule, G. Characterisation of a non-pathogenic and non-protective infectious rabbit lagovirus related to RHDV / G. Le Gall-Recule, F. Zwingelstein, M. P. Fages, S. Bertagnoli, J. Gelfi, J. Aubineau, A. Roobrouck, G. Botti, A. Lavazza, S. Marchandeu // *Virology.* — 2011. — V. 410. — P. 395–402.

112. Le Gall-Reculé, G. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus / G. Le Gall-Reculé, A. Lavazza, S. Marchandeu, S. Bertagnoli, F. Zwingelstein, P. Cavadini et al // *Vet Res.* — 2013. — V. 44. — P. 1–13.

113. Le Minor, O. Rabbit haemorrhagic disease: experimental study of a recent highly pathogenic GI.2/RHDV2/b strain and evaluation of vaccine efficacy. / O. Le Minor, S. Boucher, L. Joudou et al // *World Rabbit Science.* — 2019. — V. 27. — P. 143-146.

114. Le Pendu, J. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses / J. Le Pendu, J. Abrantes, S. Bertagnoli, J. S. Guitton, G. Le Gall-Recule et al // *J Gen Virol.* — 2017. — V. 98. — P. 1658–1666.

115. Lei, Y. X. Detection of haemagglutination titre in tissues from rabbits infected with viral haemorrhagic disease. / Y.X. Lei, T. Yaol, S.L. He // *Shanghai J. Anim. Husb. Vet. Med.* — 1985. — V. 6. — P. 19–20. (In Chinese).

116. Lemaitre, E. First complete genome sequence of a European non-pathogenic rabbit calicivirus (lagovirus GI.3) / E. Lemaitre, F. Zwingelstein, S. Marchandeau, G. Le Gall-Recule // *Arch. Virol.* — 2018. — V. 163. — P. 2921–2924.

117. Liu, J. Serological assays to discriminate rabbit haemorrhagic disease virus from Australian non-pathogenic rabbit calicivirus / J. Liu, P.J. Kerr, J.D. Wright, T. Strive // *Vet Microbiol.* — 2012. — V. 157. — P. 345–354.

118. Liu, F. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. / F. Liu, S. Ge, L. Li, X. Wu, Z. Liu, and Z. Wang. // *Research in Veterinary Science.* — 2011. — V. 93. — P. 553-559.

119. Liu, S. A new viral disease in rabbit. / S. Liu, H. Xue, B. Pu, N. Qian // *Anim. Husb. Vet. Med.* — 1984. — V. 16. — P. 253–255.

120. Lo-Man, R. A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient 69 antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. / R. Lo-Man, P. Rueda, C. Sedlik, E. Deriaud, I. Casal, and C. Leclerc. // *European journal of immunology.* — 1998. — V. 28. — P. 1401-1407.

121. Lopes, A. M. Is the new variant RHDV replacing genogroup 1 in Portuguese wild rabbit populations? / A. M. Lopes, J. Correia, J. Abrantes, P. Melo, M. Ramada, M. J. Magalhaes, P. C. Alves, P. J. Esteves // *Viruses.* — 2014. — V. 7. — P. 27–36.

122. Mage, R. G. Rabbit models of human diseases for diagnostics and therapeutics development / R. G. Mage, P. J Esteves, C. Rader // *Dev. Comp. Immunol.* — 2019. — V. 92. — P. 99-104.

123. Marcato, P. S. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome / P. S. Marcato, C. Benazzi, G. Vecchi, M. Galleotti, L. Della Salda, G. Sarli, P. Lucidi // *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* — 1991. — V. 10. — P. 371–392.

124. Marin, M. S. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine. / M. S. Marin, J. M. Martin Alonso, L. I. Perez Ordoyo Garcia, J. A. Boga, J. L.

Arguello-Villares, R. Casais, K. Venugopal, W. Jiang, E.A. Gould, F. Parra // *Virus Res.* — 1995. — V. 39. — P. 119-128.

125. Marques, R. M. Early acute depletion of lymphocytes in calicivirus-infected adult rabbits. / R. M. Marques, A. Costa-e-Silva, A. P. Águas, L. Teixeira, P. G. Ferreira // *Vet Res Commun.* — 2010. — V. 34. — P. 659–668.

126. Marques, R. M. Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance to calicivirus (RHDV) infection / R. M. Marques, E. S. A Costa, A. P. Aguas, L. Teixeira, P. G. Ferreira // *Vet. Immunol. Immunopathol.* — 2012. — V. 150. — P. 181–188.

127. Marques, R. M. Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). / R. M. Marques, L. Teixeira, A. P. Aguas, J. C Ribeiro, A. Costa-e-Silva, P. G. Ferreira // *Vet. Res.* — 2014. — V. 45. — P. 14.

128. Martin-Alonso, A. Emerging rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) at the gates of the African continent. / A. Martin-Alonso, N. Martin-Carrillo, K. Garcia-Livia, B. Valladares, P. Foronda. // *Infect Genet Evol.* — 2016. — V. 44. — P. 46–50.

129. Martin-Alonso, J. M. Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. / J. M. Martin-Alonso, S. Castanon, P. Alonso, F. Parra, R. Ordas // *Transgenic Res.* — 2003. — V. 12. — P. 127-130.

130. Marín, M. S. Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus: an efficient vaccine. / M. S. Marín, J. M. Martín Alonso, L. I. Pérez Ordoño García, J.A. Boga, J. L. Argüello-Villares, R. Casais, K. Venugopal, W. Jiang, E. A. Gould, F. Parra // *Virus Res.* — 1995. — V. 39(2-3). — P. 119-28.

131. Mateu, M. G. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. / M. G. Mateu, // *Arch Biochem Biophys.* — 2013. — V. 531. — P. 65–79.

132. Mateu, M. G. Virus engineering: functionalization and stabilization. / M. G. Mateu // *Protein Eng Des Sel.* — 2011. — V. 24. — P. 53–63.

133. McColl, K. A. Evidence for insect transmission of rabbit haemorrhagic disease virus. / K. A. McColl, J. C. Merchant, J. Hardy, B. D. Cooke, A. Robinson, H. A. Westbury // *Epidemiol. Infect.* — 2002. — V. 129. — P. 655-663.

134. McColl, K. A. Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus in decomposing rabbit carcasses. / K. A. McColl, C. J. Morrissy, B. J. Collins, H. A. Westbury // *Aust Vet J.* — 2002. — V. 80. — P. 298-299.

135. McPhee, S. R. Antibody status and survival of Australian wild rabbits challenged with rabbit haemorrhagic disease virus. / S. R. McPhee, K. L. Butler, J. Kovaliski, G. Mutze, L. Capucci, B. D. Cooke // *Wildl Res.* — 2009. — V. 36. — P. 447-456.

136. Merchán, T. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in nonspecific vertebrate hosts sympatric to the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). / T. Merchán, G. Rocha, F. Alda, E. Silva, G. Thompson, S.H. de Trucios., A. Pagés // *Infect. Genet. Evol.* — 2011. — V. 11. — P. 1469-1474.

137. Metz, S. W. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. / S.W Metz, G.P. Pijlman // *J. Invertebr. Pathol.* — 2011. — V. 107. — P. 16–30.

138. Meyers, G. Rabbit hemorrhagic disease virus molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. / G. Meyers, C. Wirblich, H.J. Thiel // *Virology.* — 1991. — V. 184. — P. 664–676.

139. Meyers, G. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. / G. Meyers, C. Wirblich, H.J. Thiel, J.O. Thumfart // *Virology.* — 2000. — V. 276. — P. 349–363.

140. Meyers, G. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. / G. Meyers, C.H. Wirblich, H-J. Thiel // *Virology.* — 1991b. — V. 184. — P. 677–686.

141. Mikami, D. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. / D. Mikami, J. H. Park, T. Kimura, K. Ochiai, C. Itakura // *Res Vet Sci.* — 1999. — V. 66. — P. 237–242.

142. Mikschofsky, H. Optimization of growth performance of freshly induced carrot suspensions concerning PMP production / H. Mikschofsky, M. Hammer, J. Schmidtke, P. König, G. Keil, H. Schirrmeier, K. Schmidt, I. Broer // *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. — 2009. — № 45. — P. 740-749.

143. Mitro, S. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology / S. Mitro, H. Krauss // *Eur J Epidemiol*. — 1993. — V. 9. — P. 70-78.

144. Morisse, J. P. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. / J.P. Morisse, G. Le Gall, E. Boilletot // *Rev Sci Tech*. — 1991. — V. 10. — P. 269-310.

145. Morisse, J. P. Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. / J. P. Morisse, G. Le Gall, E. Boilletot // *Rev Sci Tech*. — 1991. — V. 10. — P. 283-295.

146. Moss, S. R. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus / S. R. Moss, S. L. Turner, R.C Trout, P. J. White, P.J. Hudson, A. Desai, M. Armesto, N. L. Forrester, E. A. Gould // *J. Gen. Virol*. — 2002. — V. 83. — P. 2461–2467.

147. Moussa, A. Haemorrhagic disease in lagomorphs: evidence for a calicivirus. / A. Moussa, D. Chassey, A. Lavazza, L. Capucci, B. Smid, G. Meyers, C. Rossi et al // *Vet Microbiol*. — 1992. — V. 33. — P. 375–381.

148. Mutze, G. The initial impact of rabbit hemorrhagic disease on European rabbit populations in South Australia. / G. Mutze, B. Cooke, P. Alexander // *J. Wildl. Dis*. — 1998. — V. 34. — P. 221- 227.

149. Müller, C. Crude extracts of recombinant baculovirus expressing rabbit hemorrhagic disease virus 2 VLPs from both insect and rabbit cells protect rabbits from rabbit hemorrhagic disease caused by RHDV2. / C. Müller, R. Ulrich, K. Franzke, M. Müller, B. Köllner // *Archiv. Virol*. — 2019. — V. 164. — P. 137–148.

150. Nagesha, H. S. Self-assembly, antigenicity, and immunogenicity of the rabbit haemorrhagic disease virus (Czechoslovakian strain V-351) capsid protein expressed in baculovirus. / H. S. Nagesha, L. F. Wang, A. D. Hyatt, C. J. Morrissy, C. Lenghaus, H.A. Westbury // *Arch Virol*. — 1995. — V. 140. — P. 1095–1108.

151. Neave, M. J. Robust innate immunity of young rabbits mediates resistance to Rabbit hemorrhagic disease caused by Lagovirus europaeus GI.1 but not GI.2. / M.J. Neave, R. N. Hall, N. Huang, K. A. McColl, P. Kerr, M. Hoehn, J. Taylor, T. Strive // *Viruses*. — 2018. — V. 10. — P. 512.

152. Neimanis, A. Elucidation of the pathology and tissue distribution of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 (rabbit haemorrhagic disease virus 2) in young and adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). / A. Neimanis, U. Larsson Pettersson, N. Huang, D. Gavier-Widén, T. Strive // *Vet. Res.* — 2018. — V. 49. — P. 1–15.

153. Niedźwiedzka-Rystwej, P. Phagocytosis of neutrophils in rabbit infected with antigenic variant of RHD virus / P. Niedźwiedzka-Rystwej, W. Deptuła // *Pol. J. Vet. Sci.* — 2012. — V. 15. — P. 143–150.

154. O'Keefe, J. S. Typing of rabbit haemorrhagic disease virus from New Zealand wild rabbits / J. S. O'Keefe, J. Tempero, P. H. Atkinson, L. Pacciarini, F. Fallacara, G.W. Horner, J. Motha // *N Z Vet J.* — 1998. — V. 46. — P. 42-43.

155. Ohlinger, V. F. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. / V.F. Ohlinger, B. Haas, G. Meyers, F. Weiland, H.J. Thiel // *J Virol.* — 1990. — V. 64. — P. 3331–3336.

156. Park, J. H. Pathogenesis of acute necrotic hepatitis in rabbit haemorrhagic disease. / J.H. Park, Y-S Lee, C. Itakura // *Lab Anim Sci.* — 1995. — V. 45. — P. 445–44.

157. Parkes, J. P. Antibody responses to rabbit haemorrhagic disease virus in predators, scavengers, and hares in New Zealand during epidemics in sympatric rabbit populations. / J.P Parkes, R.P Heyward, J. Henning, M.X. Motha // *N. Z. Vet. J.* — 2004. — V. 52. — P. 85–89.

158. Parra, F. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. / F. Parra, M. Prieto // *J Virol.* — 1990. — V. 64. — P. 4013-4015.

159. Patterson, R. M. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology / R. M. Patterson, J. K. Selkirk, B. A. Merrick // *Environ Health Perspect.* — 1995. — V. 103. — P. 756–759.

160. Patton, N. M. Viral hemorrhagic disease. A major new disease problem of rabbits. / N.M. Patton // *Rabbit Res.* — 1989. — V. 12. — P. 64-67.

161. Peacock, D. RHDV2 overcoming RHDV immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Australia. / D. Peacock, J. Kovaliski, R. Sinclair, G. Mutze, A. Iannella, L. Capucci // *Vet. Rec.* — 2017. — V. 180. — P. 280.

162. Peng, S. Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the mhc class I pathway. / S. Peng, I.H. Frazer, G.J. Fernando, J. Zhou // *Virology.* — 1998. — V. 240. — P. 147–157.

163. Perez-Filgueira, D. M. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. / D. M. Perez-Filgueira, P. Resino-Talavan, C. Cubillos, I. Angulo, M. G. Barderas, J. Barcena, J. M. Escribano // *Virology.* — 2007. — V. 364. — P. 422–430.

164. Philbey, A. W. Assessment of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus in fox serum as an indicator of infection in sympatric rabbit populations. / A.W. Philbey, P. D. Kirkland, G. R. Saunders // *Aust. Vet. J.* — 2005. — V. 83. — P. 97–100.

165. Plana-Duran, J. Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease. / J. Plana-Duran, M. Bastons, M. J. Rodriguez, I. Climent, E. Cortes, C. Vela, I. Casal // *Arch Virol.* — 1996. — V. 141. — P. 1423-1436.

166. Plassiart, G. Hematological parameters and viscelar lesions relationships in rabbit viral haemorrhagic disease. / G. Plassiart, J.F. Guelfi, J. P. Ganiere, B. Wang, G. Andre-Fontaine, M. Wyers // *J Vet Med B.* — 1992. — V. 39. — P. 443-453.

167. Prieto, J. M. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbits. / J.M. Prieto, F. Fernandez, V. Alvarez, A. Espi, J.F. Garcia Marin, M. Alvarez, J.M. Martin, F. Parra // *Res Vet Sci.* — 2000. — V. 68. — P. 181-187.

168. Prieto, J. M. A new nonhaemagglutinating strain of RHDV. / J. M. Prieto, J.M. Martin, A. Espi, F. Parra // *In Proceedings of the 5th International Congress of the*

European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy. — 27–30 August. — V. — P. 204–205.

169. Puggioni, G. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*) / G. Puggioni, P. Cavadini, C. Maestrale, R. Scivoli, G. Botti, C. Ligios, G. Le Gall-Reculé, A. Lavazza, L. Capucci // *Vet Res.* — 2013. — V. 44. — P. 96.

170. Robinson, A. J. Statistical models for the effect of age and maternal antibodies on the development of rabbit haemorrhagic disease in Australian wild rabbits. / A. J. Robinson, P. T. M. So, W. J. Müller, B. D. Cooke, L. Capucci // *Wildl. Res.* — 2002. — V. 29. — P. 663–671.

171. Rodak, L. Enzymelinked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. / L. Rodak, B. Smid, L. Valicek, T. Vesely, J. Stepanek, J. Hampl, E. Jurak // *J Gen Virol.* — 1990. — V. 71. — P. 1075-1080.

172. San-Miguel, B. N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. / B. San-Miguel, M. Alvarez, J.M. Culebras, J. González-Gallego, M.J. Tuñón // *Apoptosis.* — 2006. — V. 11. — P. 1945–1957.

173. Schirmbeck, R. Virus-like particles induce mhc class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen / R. Schirmbeck, W. Bohm, J. Reimann // *Intervirology.* — 1996. — V. 39. — P. 111–119.

174. Scholz, J. A new single-step protocol for rapid baculovirus-driven protein production in insect cells / J. Scholz, S. Suppmann // *BMC Biotechnol.* — 2017. — V. 17. — P. 83.

175. Shien, J. H. Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction / J. H. Shien, H. K. Shieh, L. H. Lee // *Res Vet Sci.* — 2000. — V. 68. — P. 255-259.

176. Sibilía, M. Two independent pathways of expression lead to self-assembly of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. / M. Sibilía, M.B. Boniotti, P. Angoscini, L. Capucci, C. Rossi // *J Virol.* — 1995. — V. 69. — P. 5812-5815.

177. Smid, B. Rabbit haemorrhagic disease: An investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine / B. Smid, L. Valicek, L. Rodak, J. Stepanek, E. Jurak // *Vet. Microbiol.* . — 1991. — V. 26. — P. 77–85.

178. Spohn, G. Exploiting viral properties for the rational design of modern vaccines. / G. Spohn & M. F. Bachmann // *Expert Rev Vaccines.* — 2008. — V. 7. — P. 43–54.

179. Strive, T. Identification and partial characterisation of a new lagovirus in Australian wild rabbits / T. Strive, J. D. Wright & A. J. Robinson // *Virology.* — 2009. — V. 384. — P. 97–105.

180. Strive, T. The non-pathogenic Australian rabbit calicivirus RCV-A1 provides temporal and partial cross protection to lethal Rabbit Haemorrhagic Disease Virus infection, which is not dependent on antibody titres. / T. Strive, P. Elsworth, J. Liu, J.D. Wright, J. Kovaliski, L. Capucci // *Vet. Res.* — 2013. — V. 44. — P. 51.

181. Sánchez-Campos, S. Pathogenic molecular mechanisms in an animal model of fulminant hepatic failure: Rabbit haemorrhagic viral disease. / S. Sánchez-Campos, M. Alvarez, J. M. Culebras, J. Gonzalez-Gallego, M.J. Tunon // *J Lab Clin Med.* — 2004. — V. 144. — P. 215–222.

182. Thompson, J. Rabbit calicivirus disease now established in New Zealand. / J. Thompson, G. Clark // *Surveillance.* — 1997. — V. 24. — P. 5-6.

183. Thouvenin, E. Bivalent binding of a neutralising antibody to a calicivirus involves the torsional flexibility of the antibody hinge / E. Thouvenin, S. Laurent, M. F. Madelaine, D. Rasschaert, J. F. Vautherot, E. A. Hewat // *J Mol Biol.* — 1997. — V. 270. — P. 238-246.

184. Tian, L. Isolation and identification of a non-haemagglutinating strain of rabbit hemorrhagic disease virus from China and sequence analysis for the VP60 Gene. / L. Tian, J. Liao, J-W. Li, W-R Zhou, X-L. Zhang, H-N. Wang, // *Virus Genes.* — 2007. — V. 35. — P. 745–752.

185. Tokarz-Deptuła, B. Immunity phenomena in rabbits infected with the RHD virus (Rabbit Haemorrhagic Disease). / B. Tokarz-Deptuła // *Pol J Env Stud.* — 2009. — V. 7. — P. 1–84.

186. Torres, J. M. Safety evaluation of a recombinant myxoma-RHDV virus inducing horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vaccine*, 19: 174-182. / J.M. Torres, M.A. Ramírez, M. Morales, J. Bárcena, B. Vázquez, E. Espuña, A. Pagès-Manté, J.M. Sánchez-Vizcaíno // *Vaccine*. — 2000. — V. 19. — P. 174-182.
187. Trowitzsch, S. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production / S. Trowitzsch, C. Bieniossek, Y. Nie, F. Garzoni, I. Berger // *J Struct Biol*. — 2010. — V. 172. — P. 45–54.
188. Valicek, L. Electron and immunoelectronmicroscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). / L. Valicek, B. Smid, L. Rodak, J. Kudrna // *Arch Virol*. — 1990. — V. 112. — P. 271-275.
189. Van Oers, M. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology. / M.M. Van Oers, G.P. Pijlman, J.M. Vlak // *J. Gen. Virol*. — 2015. — V. 96. — P. 6–23.
190. Venter, P. A. Multivalent display of proteins on viral nanoparticles using molecular recognition and chemical ligation strategies. / P. A Venter et al. // *Biomacromolecules*. — 2011. — V. 12. — P. 2293–2301.
191. Wagner, R. Induction of a mhc class I-restricted, CD8 positive cytolytic T-cell response by chimeric HIV-1 virus-like particles in vivo: Implications on HIV vaccine development / R. Wagner, L. Deml, R. Schirmbeck, J. Reimann, H. Wolf // *Behring Inst. Mitt*. — 1994. — V. 95. — P. 23–34.
192. Wang, Y. K. A new viral disease in rabbits—Rabbit pest / Y.K. Wang // *Sci. Agric. Sin*. — 1988. — V. 21. — P. 6–11 (In Chinese).
193. Wang, X. Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography / X. Wang et al // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. — (2012). — V. 145. — P. 277– 282.
194. Westcott, D.G. Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain / D. G. Westcott, J. P. Frossard, D. Everest, A. Dastjerdi, J. P. Duff, F. Steinbach, B. Choudhury // *Vet Rec*. — 2014. — V. 174. — P. 333.

195. Win, S. J. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway. / S. J. Win, V. K. Ward, P. R. Dunbar, S. L. Young, M.A. Baird // *Immunol. Cell Biol.* — 2011. — V. 89. — P. 681–688.

196. Wirblich, C. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies / C. Wirblich, H. J. Thiel, G. Meyers // *J Virol.* — 1996. — V. 70 (11). — P. 7974-7983.

197. Xu, W.Y. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterization / W.Y. Xu // *Rev Sci Tech.* — 1991. — V. 10. — P. 393-408.

198. Xu, Z. J. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review / Z. J. Xu, W. X. Chen // *Vet Res Commun.* — 1989. — V. 13. — P. 205-212.

199. Xu, L. A. Broadly Cross-protective Vaccine Presenting the Neighboring Epitopes within the VP1 GH Loop and VP2 EF Loop of Enterovirus 71 / L. Xu, et al // *Sci Rep.* — 2015. — V. 5. — P. 12973.

200. Zheng, T. Rabbit haemorrhagic disease: advantages of cELISA in assessing immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). / T. Zheng, J.P. Parkes // *Vet Microbiol.* — 2011. — V. 153. — P. 387-392.

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям Мухину А. Н. и Ездаковой И. Ю., а также Алексееву К. П., Южакову А. Г. Особая благодарность профессору Верховскому О. А., профессору Алиперу Т. И, д.б.н Соболевой Г. Л, к.в.н Раеву С. А.

12. ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

1. СТО 00496165-0002-2021 Набор для иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу геморрагической болезни кроликов в сыворотке крови.
2. МУК Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в патологическом материале методом сэндвич-ИФА ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И
Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)



УТВЕРЖДАЮ

Директор
ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
А.М. Гулюкин
«30» июля 2021 г.

**СТАНДАРТ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН
СТО 00496165-0002-2021**

**Набор для иммуноферментного анализа для выявления антител к
вирусу геморрагической болезни кроликов в сыворотке крови**

Технические условия

2021 г.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель секции

«Зоотехния и ветеринария»

Отделения сельскохозяйственных

наук РАН, академик РАН

 В. В. Калашников

«15»  2022 г.



Методические рекомендации

**Обнаружение вируса геморрагической болезни кроликов в
патологическом материале методом сэндвич-ИФА**

Москва - 2022