

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

Автореферат

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Научные руководители:

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

Официальные оппоненты:

Литвинов Олег Борисович - доктор ветеринарных наук, профессор, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К. И. Скрябина

Платонов Михаил Евгеньевич – кандидат биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева» (ФГБНУ НИИПЗК)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 г. в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.249.01 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел.: +7 (495) 970-0367.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и на сайте <http://www.viev.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук, профессор

Найманов А.Х.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Наибольший экономический ущерб, наносимый кролиководству, связан с инфекционной патологией и в первую очередь с вирусной геморрагической болезнью кроликов (другие названия "некротический гепатит" или "геморрагическая пневмония" кроликов) — это высоко контагиозное, остропротекающее заболевание, которое характеризуется явлениями геморрагического диатеза во всех органах, особенно в печени и легких. Вирус поражает помимо кроликов, также и популяции зайцев, тем самым идет влияние на зависимых от них хищников (Gregg D.A et al., 1991; Grgacic, E.V.L. et al., 2006; Delibes-Mateos, M. et al., 2007).

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 был идентифицирован в России. 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 (Le Minor, O et al., 2019). 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. (Кольцов, А. Ю и др., 2020), но биологические свойства его недостаточно изучены.

Геном возбудителя геморрагической болезни кроликов 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 (Meyers, G et al., 1991). ORF1 кодирует неструктурные белки и основной капсидный белок **VP60** (Abrantes, J et al., 2012; Dalton, K. P et al., 2015), 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 (Wirblich, C et al., 1996).

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.

Определение уровня специфических к вирусу ГБК антител проводят в РТГА, которая также является низко специфичной и сложно выполнимой 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 связано с необходимостью соблюдения строгих мер биобезопасности и биоэтики.

Степень разработанности темы исследования. До проводимых исследований было известно, что полученные в бакуловирусной системе экспрессии рекомбинантные белки (recVP60) способны самособираться 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 (Васильев, Ю. М., 2008). 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 бакуловирусная система экспрессии является лучшей для получения рекомбинантных белков с целью получения ВПЧ. Было показано, что ВПЧ обладают биологическими свойствами, характерными для вирусных частиц (Spohn, G et al., 2008) и индуцируют полную защиту кроликов от заболевания (Crisci, E et al., 2012).

Наличие антигенных свойств у recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 (Frantz, F.G et al., 2011) 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-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. Поэтому важно было разработать высокоспецифичные, чувствительные и доступные методы, такие как ИФА, для лабораторной диагностики ВГБК.

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.

Основные задачи исследований:

1. Определить полную нуклеотидную последовательность и провести филогенетический анализ генома шт. «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа.
2. Разработать технологию получения рекомбинантных главных капсидных белков VP60 (recVP60) вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в бакуловирусной системе экспрессии генов и охарактеризовать полученные продукты.
3. Изучить антигенные и иммуногенные свойства полученных recVP60 для кроликов.
4. Разработать тест-систему (АТ-ВГБК) на основе recVP60 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- ВГБК) для выявления вируса ГБК в патологическом материале и для определения концентрации гесVP60 в образцах культуральной жидкости в процессе получения гесVP60.

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 и 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.), а также 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 интернациональной конференции AGRITECH V-2021.

Публикации. На основе диссертационной работы опубликованы 5 научных работ, в том числе 3 работы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 работа в журнале, индексируемом в базе SCOPUS.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 115 стр. компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Материалы диссертации иллюстрированы 14 таблицами и 22 рисунками. Список литературы включает 200 источников (20 отечественных и 180 зарубежных авторов).

Основные положения, выносимые на защиту.

- определение нуклеотидной последовательности и изучение филогенетического анализа генома шт. «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа

- технология получения рекомбинантных главных капсидных белков VP60 (resVP60) вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в бакуловирусной системе экспрессии генов

- результаты исследований по изучению антигенных и иммуногенных свойств полученных resVP60 для кроликов

- разработка тест-системы (АТ-ВГБК) на основе resVP60 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в формате непрямого ИФА для обнаружения антител к вирусу ГБК и дальнейшее применение разработанной тест-системы для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу ГБК у кроликов

- разработка тест-системы (АГ-ВГБК) в формате сэндвич-ИФА для выявления антигена вируса ГБК на основе использования моноклональных антител к основному капсидному белку VP60 вируса ГБК и дальнейшее применение разработанной тест-системы (АГ-ВГБК) для выявления вируса ГБК в патологическом материале и для определения концентрации resVP60 в образцах культуральной жидкости в процессе получения resVP60.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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). В работе использовались естественно-восприимчивые животные – кролики (N=100), патологический материал (N=30) и сыворотки кроликов (N=140).

В работе использовали вирусы ГБК шт. «Воронежский-87», относящийся к геногруппе GI.1 с активностью в РГА 1:2048 (10^4 ЛД₅₀/см³) и шт. «Тула», относящийся к геногруппе GI.2 с активностью в РГА 1:2048 (10^4 ЛД₅₀/см³).

Наличие РНК вируса ГБК в 10% суспензии печени кролика определяли методом обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Секвенирование производили на геномном анализаторе AB3130 (Applied Biosystems, США). Анализ полученных последовательностей и построение филогенетических дендрограмм проводили при помощи программ Lasergene 11.1.0. и MEGA 7.0.18 (США).

В работе была использована система бакуловирусной экспрессии Vac-to-Vac (Invitrogen, США). Конструирование рекомбинантного бакуловируса осуществляли согласно рекомендациям производителя. Затем методом щелочного лизиса производили выделение и очистку рекомбинантной ДНК Бак-VP60. Для химической трансфекции и получения рекомбинантных бакуловирусов использовали культуру клеток насекомых Sf-9, а для получения recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 культуру клеток насекомых Hi-5.

Уровень экспрессии и относительное содержание recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в лизате клеток насекомых Hi-5 определяли в ИФА с помощью набора INgezim RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 (Ingenaza, Испания).

Наличие экспрессии и специфичность полученных рекомбинантных белков определяли методами **электрофореза** белков в полиакриламидном геле по методу Laemmli.

Для постановки **иммуноблоттинга** после электрофоретического разделения recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 переносили на мембрану «Immobilon-NC» (Millipore, США) при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 часа при комнатной температуре.

Для идентификации recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 мембраны инкубировали с моноклональными антителами к структурному белку капсида вируса ГБК мечеными пероксидазой хрена (АНО «НИИДПБ», Россия Ingenaza, Испания) в растворе ФСБТ, содержащем 3% Gelatine Blocking Grade (в разведении 1:100).

Полученные recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 подвергали **очистке** методом афинной хроматографии в денатурирующих условиях с 8М мочевиной согласно рекомендациям производителя.

Концентрацию общего белка в очищенных препаратах проводили с помощью набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США), согласно инструкции производителя.

Для **определения гемагглютинирующей активности** recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 проводили постановку РГА, для этого использовали 0,75% суспензию эритроцитов человека I группы.

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

Антигенную активность recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 исследовали путем иммунизации кроликов. Все сыворотки исследовали до и через 21 сутки после иммунизации. Полученные сыворотки использовали для постановки в РТГА и ИФА. В РТГА каждую сыворотку исследовали с разными вариантами рабочего вируса: recVP60-GI.1, recVP60-GI.2, вирус ГБК 1-го генотипа шт. «Воронежский-87» и вирус ГБК 2-го генотипа шт. «Тула». РТГА ставили с эритроцитами человека I группы. Для выявления антител к вирусу ГБК в ИФА использовали набор INgezim RHDV 1.7.RHD.K.1 (Ingenaza, Испания).

Проводили РТГА с перекрестной постановкой сывороток с гомологичными и гетерологичными антигенами, данные использовали для **определения антигенного родства**, которое рассчитывается по формуле Архетти и Хорсфала.

Определение **иммуногенной активности** recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 проводили на кроликах, использованных в опыте по определению антигенной активности. Через 21 сутки после иммунизации, животных подвергали

контрольному заражению вирулентными штаммами «Воронежский-87» вируса ГБК 1-го генотипа и штаммом «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа в дозе 1000 ЛД₅₀.

Каждую группу, состоящую из 10 животных, разделяли на две подгруппы. 5 кроликов инфицировали шт. вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87», а оставшихся 5 кроликов - шт. вируса ГБК 2-го генотипа «Тула». Таким образом мы хотели доказать, что два генотипа вируса ГБК, хоть и схожи между собой, но при заражении животные устойчивы строго к тому генотипу вируса, каким были иммунизированы. Учет результатов проводили на 10-е сутки после заражения.

Для **выявления специфических антител** к вирусу ГБК у кроликов проводили ИФА. Для подбора «подложки» растворы гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 сорбировали на иммунологический планшет с конечной концентрацией по белку 10 мкг\мл и в дальнейшем проводили титрацию сыворотки, начиная с 1:200.

Разработанную тест-систему (АТ-ВГБК) использовали для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу ГБК у кроликов. Для этого провели исследования 30 сывороток кроликов до и после иммунизации вакциной против ВГБК тканевой инактивированной гидроокисьалюминиевой (организация-разработчик- ФГБНУ ФИЦВиМ).

В АНО «НИИДПБ» были переданы полученные гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 и на их основе были разработаны моноклональные антитела и пероксидазные конъюгаты, которые использовали для постановки **сэндвич-ИФА для выявления вируса ГБК в патологическом материале и гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 в культуральной жидкости.**

В лунки иммунологического полистиролового планшета сорбировали 100 мкл раствора моноклональных антител к главному капсидному белку

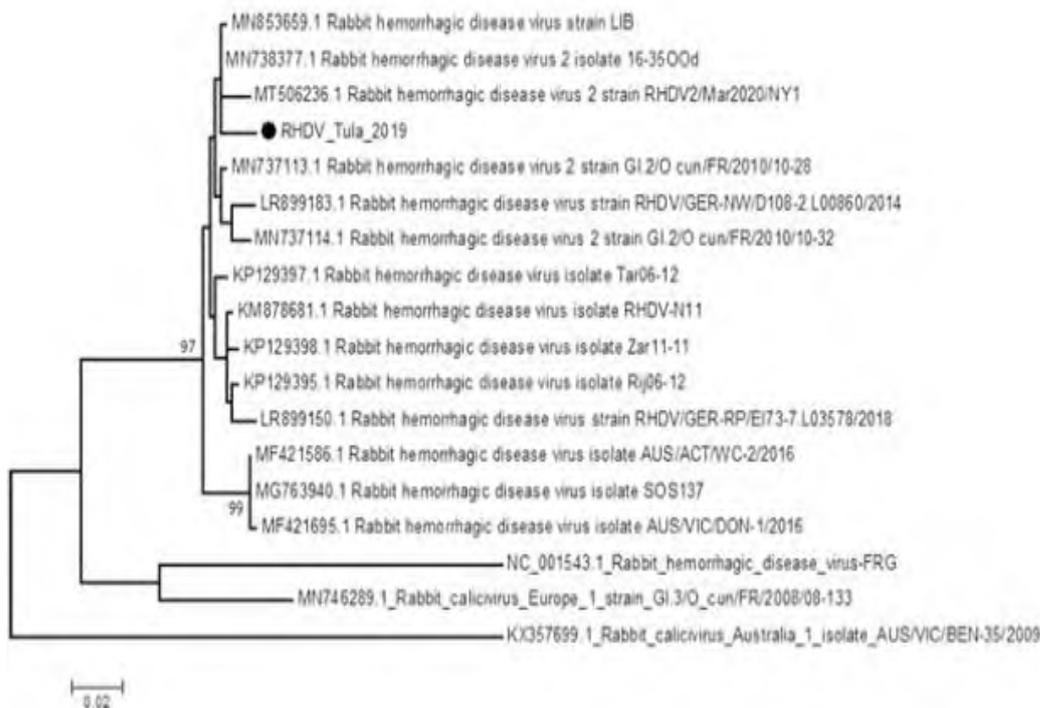
VP60 вируса ГБК на КББ из расчета 10 мкг белка на лунку. Затем провели исследование образцов печени от животных в 2-х повторах в объеме 100 мкл. Для подтверждения полученных результатов в разработанной нами тест-системе (АГ-ВГБК), были проведены исследования этих проб методом ПЦР.

Чувствительность и специфичность разработанных в данной научной работе тест-систем определяли согласно «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals».

Результаты собственных исследований. В результате проведенных работ была определена полная нуклеотидная последовательность генома и проведен филогенетический анализ штамма «Тула» вируса ГБК 2-го генотипа (рис. 1).

Рисунок 1.

Филогенетическая дендрограмма вируса ГБК 2-го генотипа шт. «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.

В результате проведенных работ были получены рекомбинантные вирусы ядерного полиэдроза калифорнийской совки *Autographa californica* (AcNPV) со вставкой ORF-1 вируса ГБК генотипа G.II (AcORF-1- GI.1) и генотипа GI.2 (AcORF-1- GI.2). Определение наличия нуклеотидных последовательностей ORF-1 вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 посредством амплификации фрагмента нуклеотидной последовательности, включающей фрагмент генома AcNPV и части экспрессионной кассеты с геном ORF-1 вируса геморрагической болезни кроликов генотипов GI1 или GI2, показало их наличие, рисунок 2.

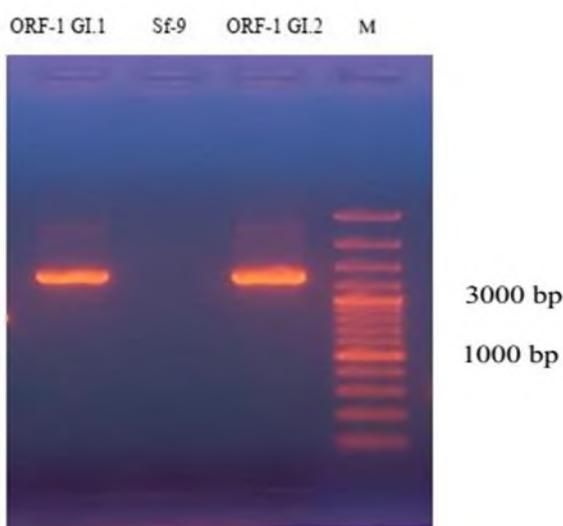


Рисунок 2.

Электрофореграмма амплифицированных фрагментов геномов рекомбинантных бакуловирусов

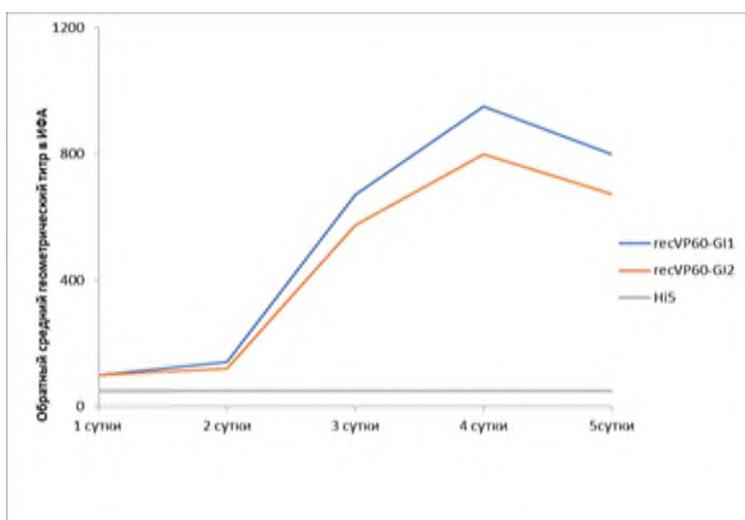


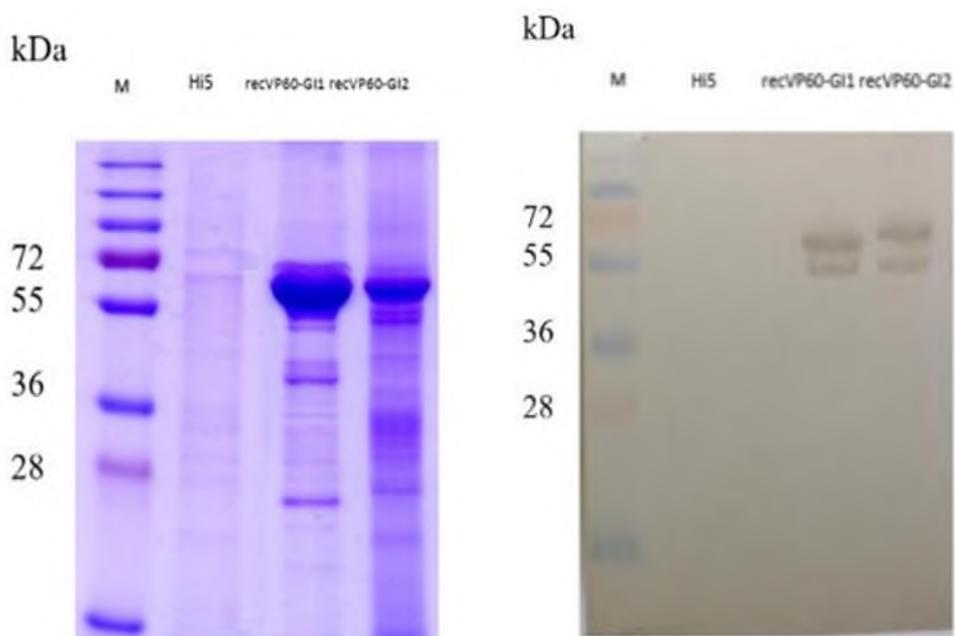
Рисунок 3.

Динамика накопления recVP60-GI1 и recVP60-GI2 в к.кл. Hi-5

Уровень экспрессии recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 определяли методом титрования антигена в ИФА. На рис.3 показано, что максимальное накопление антигенов в лизате клеток Hi-5 происходит на 3-4 сутки.

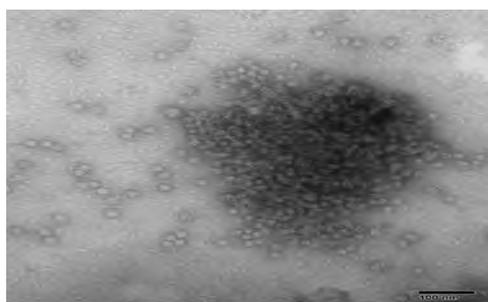
После очистки 1г клеточных осадков было получено 5 мл препарата recVP60-GI.1 с концентрацией общего белка 20 мг\мл и 4 мл препарата recVP60-GI.2 с концентрацией общего белка 18 мг\мл.

Электрофорез в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг после электрофоретического разделения показали наличие в пробах белков с мол. массой около 60 kDa, которые окрасились МАТ к структурному белку капсида вируса ГБК мечеными пероксидазой хрена (рисунки 4 и 5).



Гемагглютинирующая активность очищенных препаратов recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 с концентрацией 50 мкг\мл в PBS составила 1:32000.

В растворах recVP60-GI.1, recVP60-GI.2 и их смеси 1:1 с концентрацией по общему белку 10 мг\мл при проведении электронной микроскопии наблюдали вирусоподобные частицы размером 15-30 нм (рисунки 6 и 7).



*Рисунок 6 и 7
Электронно-микро-
скопическое изображение
ВПЧ recVP60*

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

Кролики были разделены на группы и иммунизированы:

1 группа (N=10) - recVP60-GI.1 50 мкг в/м;

2 группа (N=10) - recVP60-GI.2 50 мкг в/м;

3 группа (N=10) - recVP60-GI.1 25 мкг + recVP60-GI.2 25 мкг в/м;

4 группа (N=10) - контрольная группа, животных этой группы не вак-

цинировали.

До вакцинации при проведении ИФА и РТГА животные были серонегативны в отношении ВГБК. На 21 сутки после однократного введения 50 мкг рекомбинантных капсидных белков у всех иммунизированных кроликов наблюдалась выраженная сероконверсия. Уровень антител к recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 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. У кроликов контрольной группы сероконверсии не наблюдалось.

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

Таблица 1.

Сыворотка крови кроликов 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

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

Антигенное родство между recVP60-GI.1 и recVP60-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 recVP60-GI.1 и шт. вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» и между recVP60-GI.2 и шт. вируса ГБК 2-го генотипа «Тула» составило 99% и 97%.

Степень антигенного родства между recVP60-GI.1 и шт. вируса ГБК 2-го генотипа «Тула» составила 72%, а между recVP60-GI.2 и шт. вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» 74%.

Согласно J. Brooksby 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.

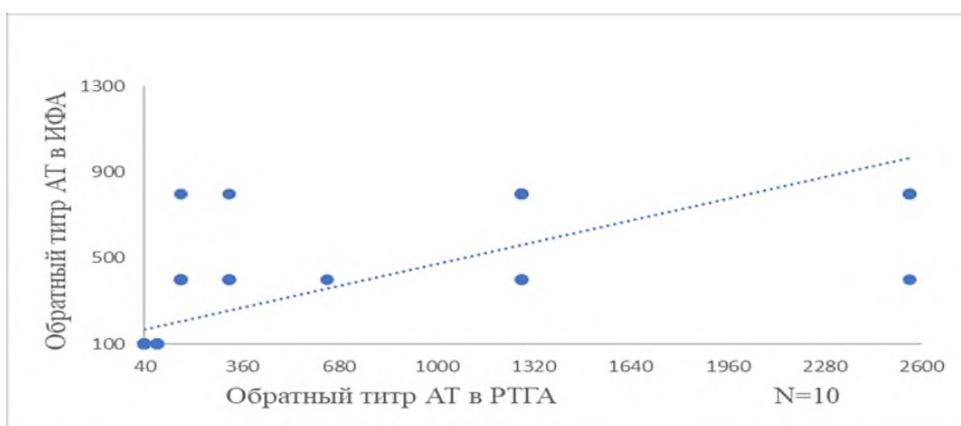


Рисунок 8.

Определение степени корреляции полученных результатов при постановке ИФА и РТГА.

Анализ полученных результатов свидетельствует о положительной корреляции между титрами антител к ВГБК, выявляемыми 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.

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.

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+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.2 и смесью recVP60-GI.1+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.

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 этого на планшеты сорбировали recVP60-GI.1, recVP60-GI.2 и их смесь в соотношении 1:1 в различных концентрациях. Далее на этих подложках ставили ИФА с положительными и отрицательными к recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 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 9-11.

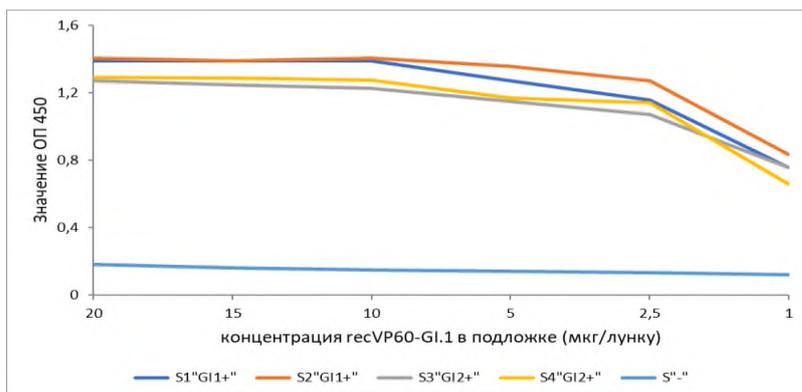


Рисунок 9.

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

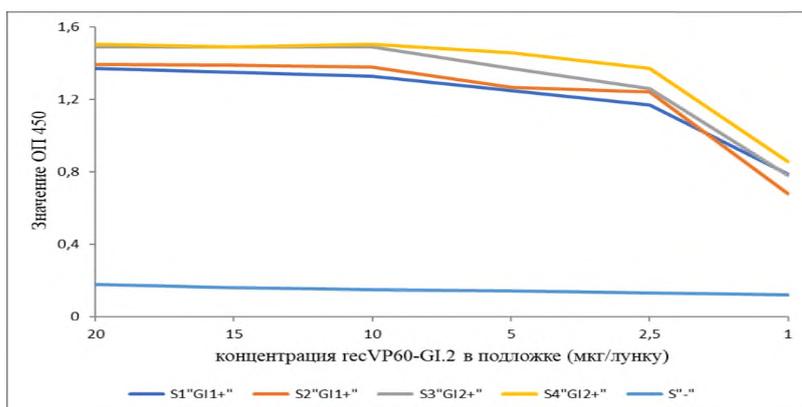


Рисунок 10.

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

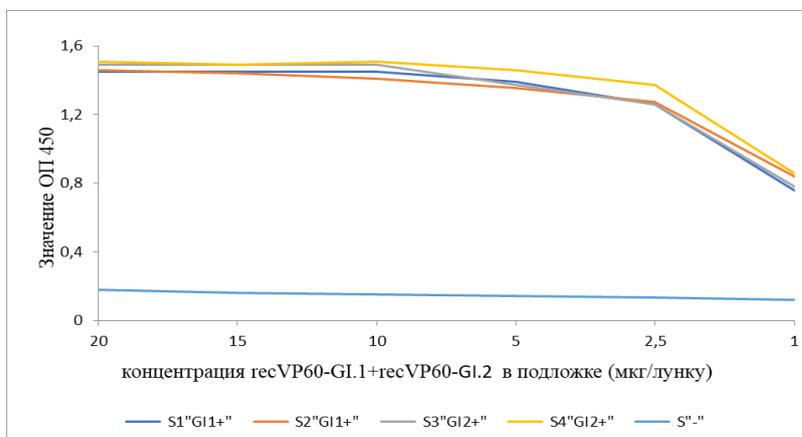


Рисунок 11.

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 12-14.

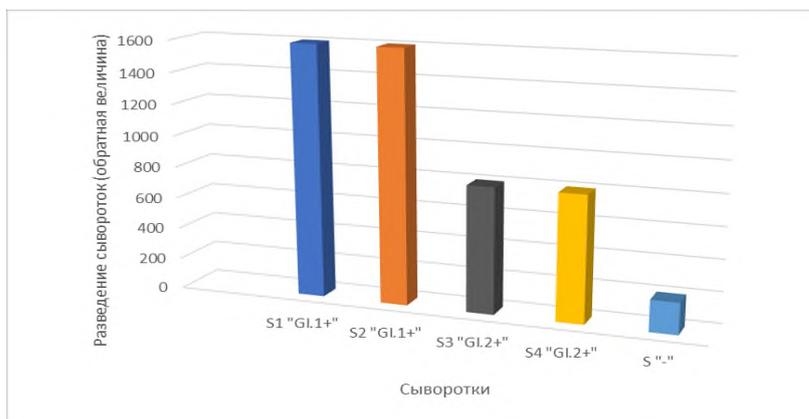


Рисунок 12.

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

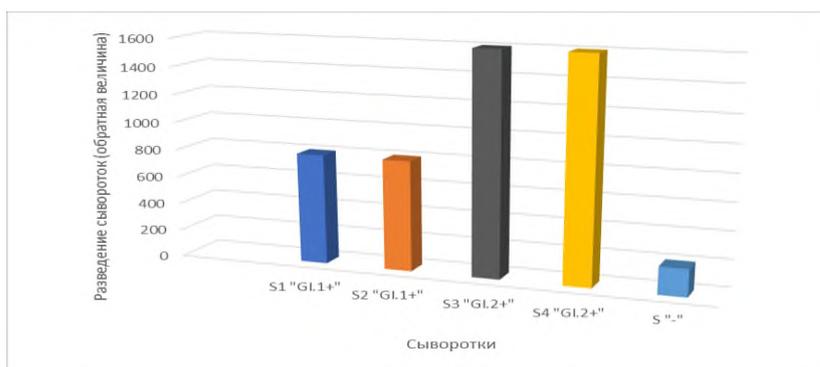


Рисунок 13.

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

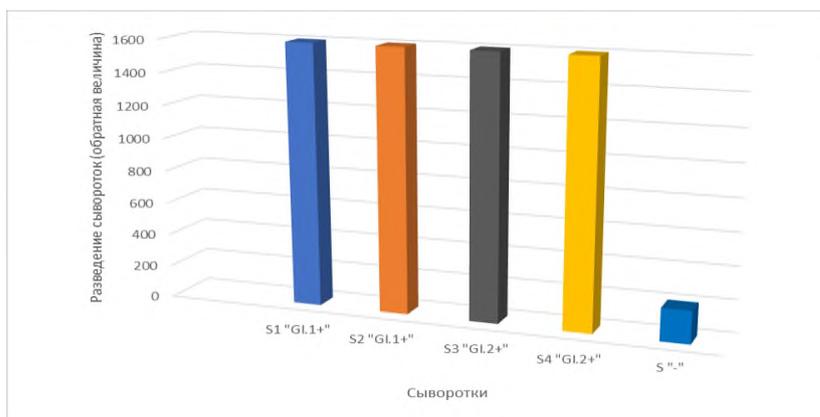


Рисунок 14.

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

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. Диагностическая чувствительность составила 98 %; диагностическая специфичность 96,6 %; совпадаемость результатов двух методов 97,5 %.

Было исследовано 80 проб. Полученные результаты свидетельствуют о положительной корреляции между титрами антител к вирусу ГБК выявляемых в сыворотках крови кроликов в двух тест-системах методами ИФА ($r=0,97$; $p<0,05$). При этом, для сывороток крови кроликов, содержащих антитела к вирусу ГБК 2-го генотипа (группы иммунизированные recVP60-GI.2 и смесью recVP60-GI.1+ 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.

Провели разработку сэндвич-ИФА (АГ-ВГБК) для выявления recVP60-GI.1 и recVP60-GI.2 в культуральной жидкости и вируса ГБК 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 (рис.15).

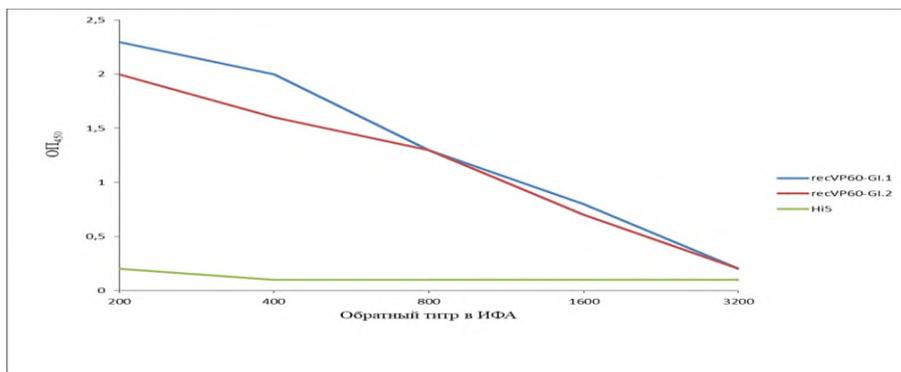


Рисунок 15.

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 16.

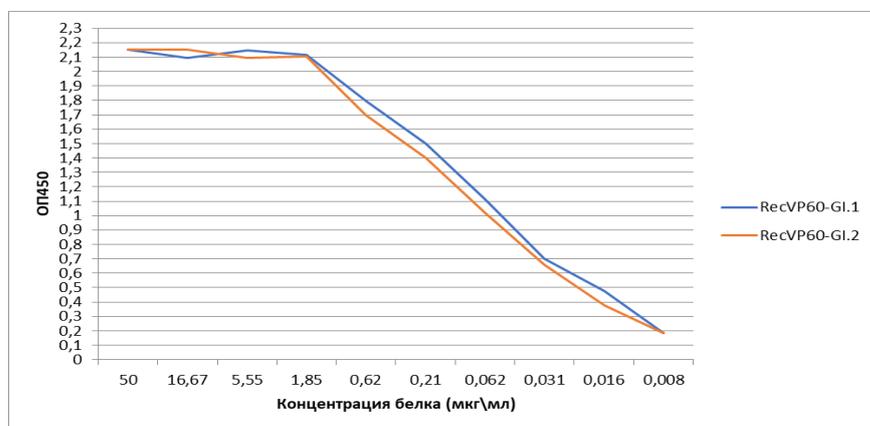


Рисунок 16.

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

С помощью, разработанной тест системы (АГ-ВГБК), были проведены исследования образцов патологического материала, полученного от павших и больных животных. 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.

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

Заключение. 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. **В результате исследований сделаны 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 геморрагической болезни кроликов 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 ($8,64-9,64 \log_2$) и 1:1280-1:2560 ($10,32-11,32 \log_2$) 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 получения белков, с чувствительностью 0,02 мкг\мл.

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.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки. 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 вирусной геморрагической болезни кроликов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Selezneva E.V**, Mukhin A.N, Aliper T.I, Verkhovsky O.A, Ezbekova I.Y The application of recombinant vp60-based elisa for haemorrhagic disease virus antibody detection to vaccination against RHD / **E.V. Selezneva**, A.N. Mukhin, T. I. Aliper, O.A. Verkhovsky, I.Y. Ezbekova // AIP Conference Proceedings. 2. Сер.

"Proceedings of the II International Conference on Advances in Materials, Systems and Technologies, CAMSTech-II 2021" —2022. — С. 070028.

2. **Селезнева Е. В** Оценка безвредности рекомбинантных главных капсидных белков VP60 (RECVP60) вируса геморрагической болезни кроликов генотипов GI1 и GI2 при применении кроликам. Актуальные проблемы науки и техники. Инноватика. Сборник научных статей по материалам X Международной научно-практической конференции. В 3 частях. Том Часть 1. Уфа —2023. — С. 13-21

3. Алексеев К. П. Получение рекомбинантного капсидного белка VP60 вируса геморрагической болезни кроликов и изучение его антигенной и иммуногенной активности / К. П. Алексеев, А. С. Москвина, О. А. Верховский, **Е. В. Селезнева**, О. Ю. Черных, А. Н. Мухин // Ветеринария Кубани — 2020. — №5. — С. 34-37.

4. 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.

5. Мухин, А. Н. Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (Caliciviridae: Lagovirus) геногрупп GI1, GI2 / А. Н. Мухин, К. П. Алексеев, А. Г. Южаков, **Е. В. Селезнева**, А. С. Москвина, О. А. Верховский // Вопросы вирусологии. — 2023. — № 68 (2). — С. 132-141.

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.