

ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ КРОЛИКОВ

РЕЗЮМЕ

Описание болезни: Геморрагическая болезнь кроликов (ГБК) это высококонтагиозный, острый, смертельно опасный гепатит европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*), вызываемый калицивирусом (род *Lagovirus*). До 2010 года все изолированные вирусы ГБК (*RHDV*) относили к одному из шести идентифицированных генотипов (GI–GVI), среди которых GVI представляет собой антигенный подтип (*RHDVa*). В 2010 году был идентифицирован еще один вирус ГБК, филогенетически и антигенно отличающийся от вируса ГБК и названный *RHDV2* или *RHDVb*. Аналогичное заболевание, называемое «синдром европейского зайца-русака», описано у зайцев (*Lepus europaeus*).

ГБК характеризуется тяжелым течением болезни и высоким уровнем смертности, составляющим 70–90% для *RHDV/RHDVa* и 5–70% для *RHDV2*. Инфекция попадает в организм, главным образом, через рот. Насекомые считаются важным путем заражения или передачи возбудителя и, зачастую, распространения заболевания на дальние расстояния, в первую очередь, среди диких кроликов. Инкубационный период составляет от 1 до 3 дней, гибель животного обычно наступает через 12–36 часов после появления лихорадки. Основными клиническими проявлениями острой инфекции являются признаки поражения нервной и респираторной систем, апатия и анорексия. У кроликов моложе 4-6 недель течение болезни, вызываемой *RHDV/RHDVa*, носит субклинический характер, но если возбудителем, вызвавшим заболевание, является *RHDV2*, то клинические признаки и смертность наблюдаются даже у молодых животных, начиная с возраста 15-20 дней.

Идентификация возбудителя: Печень и селезенка кроликов, умерших от острой ГБК, содержит очень высокие концентрации вируса. Следовательно, сразу несколько методов анализа могут гарантировать достоверность диагноза. Учитывая отсутствие восприимчивых клеточных субстратов для диагностики *in vitro*, основными лабораторными тестами, используемыми для диагностики, являются амплификация РНК (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией [ОТ-ПЦР]) и иммуноферментный анализ (ИФА) «сэндвич»-методом, основанный на использовании моноклональных антител (MAb). Для дифференциации *RHDV*, *RHDVa* и *RHDV2* необходим отбор и использование специфических праймеров и моноклональных антител. Поскольку вирусы ГБК вызывают гемагглютинацию человеческих красных кровяных телец 0 группы, для исследования может быть использована реакция гемагглютинации (РГА), но следует помнить о том, что к настоящему моменту идентифицированы также ГА-негативные разновидности вируса ГБК. Кроме того, возможно обнаружение частиц вируса ГБК в гомогенатах печени при помощи электронной микроскопии. Диагностика хронической ГБК может быть затруднена присутствием в образцах высоких титров антител к *RHDV*, что обуславливает возможный ложноотрицательный результат ИФА и, в особенности, теста на гемагглютинацию.

Серологические исследования: Гуморальный иммунитет представляет собой основную защиту против вируса ГБК, и даже низкий уровень специфических антител к *RHDV* обеспечивает полную защиту от заболевания. В основе наиболее эффективных методов серологического исследования лежит принцип конкурентного ИФА с использованием специфических моноклональных антител к *RHDV*. Эти методы позволяют также дифференцировать заражение или вакцинацию *RHDV* и *RHDV2* у ранее неинфицированных кроликов. Кроме того, количественное определение изотипов специфических иммуноглобулинов к *RHDV* (IgM, IgA и IgG) методом ИФА помогает отличить первичное инфицирование от повторной инфекции или вакцинации. Высокую диагностическую чувствительность демонстрирует классический прямой ИФА, для которого требуются очищенный *RHDV* или рекомбинантные вирусоподобные частицы (ВПЧ) для адсорбции на твердой фазе. Однако деформация белковой оболочки вируса при адсорбции на планшете приводит к экспозиции внутренних эпитопов, общих для *RHDV* и кроличьего калицивируса (*RCV*), что снижает специфичность теста.

Требования к вакцинам: Непрямой контроль заболевания легко достижим посредством вакцинации. Хотя капсид вирусов ГБК был экспрессирован в виде рекомбинантных вирусоподобных частиц, по состоянию на 2015 год использовались инактивированные и адъювантные вакцины, приготовленные из материала печени экспериментально инфицированных кроликов. У вакцинированных животных быстро (в течение 7–10 дней) развивается надежный иммунитет против вируса ГБК. Экспериментальные данные показывают, что защита сохраняется в течение длительного времени (более 1 года). Поскольку *RHDV2* представляет собой отдаленный антигенный подтип или даже второй серотип *RHDV*, то настоятельно рекомендуется комбинированная вакцинация с использованием обоих типов антигенов или использование вакцины, гомологичной штамму вируса ГБК, идентифицированному в ходе эпидемии или вспышки болезни.

А. ВВЕДЕНИЕ

Геморрагическая болезнь кроликов (ГБК) представляет собой высококонтагиозный и смертельно опасный гепатит дикого и домашнего европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*). ГБК вызывается калицивирусом (род *Lagovirus*, семейство *Caliciviridae*) – небольшим безоболочечным РНК-содержащим вирусом, имеющим один основной капсидный белок (VP60) (Ohlinger *et al.*, 1990). Род *Lagovirus* включает также вирус EBHSV, вызывающий у зайцев-русаков (*Lepus europaeus*) болезнь под названием «синдром европейского зайца-русака», очень схожую с ГБК. Несмотря на близкое генетическое родство (сходство нуклеотидного состава VP60 составляет 70%), RHDV и EBHSV являются двумя различными видами вирусов (Lavazza *et al.*, 1996; Wirblich *et al.*, 1994).

Результаты генетического сопоставления и сравнения антигенов, а также изучения эпидемиологических данных указывают на существование трех основных групп вируса ГБК (RHDV):

- 1) «Классический RHDV», включающий геногруппы G1–G5, о котором впервые было сообщено в КНР в 1984 году (Liu *et al.*, 1984). К настоящему моменту этот вид RHDV обнаружен в более чем 40 странах Азии, Африки, Южной и Северной Америки, Европы и Океании и широко распространен на большей части тех территорий мира, где европейский кролик живет в природе или одомашнен.
- 2) Подтип RHDVa/G6 идентифицирован в Европе в 1996 году (Carucci *et al.*, 1998; Schirrneier *et al.*, 1999) и в настоящее время обнаружен на других континентах (Океания, Азия и Южная и Северная Америка).
- 3) «Новый» RHDV (условно названный RHDV2 или RHDVb) был обнаружен во Франции в 2010 году у диких кроликов и у вакцинированных животных на кроличьих фермах (Dalton *et al.*, 2012; Le Gall-Reculé *et al.*, 2001, 2013) и быстро распространился по Европе и в странах Средиземноморского бассейна (Мальта и Тунис), а в 2015 году появился в Австралии. По данным некоторых авторов (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013), RHDV2 происходит не от классического RHDV, но, скорее, представляет собой второе появление вируса неизвестного происхождения. Данные, полученные в отношении антигенов и защиты от болезни, позволили классифицировать RHDV2 как второй серотип RHDV.

ГБК характеризуется тяжелым течением, однако процент смертности для различных типов вируса неодинаков. Инкубационный период для RHDV/RHDVa составляет 1–3 дня, гибель животного обычно наступает через 12–36 часов после появления лихорадки (смертность 80–90%). Примерно у 5–10% кроликов наблюдается клиническая картина подостро-хронического течения заболевания. Хотя заражению подвержены кролики любого возраста, у животных младше 6–8 недель от роду болезнь носит скрытый характер. Заболевание, вызываемое RHDV2, имеет свои типичные особенности: процент смертности ниже, но широко варьирует (5–70%), причем у экспериментально инфицированных кроликов средний показатель смертности составил 20%. Гибель наблюдается в период лактации, начиная с возраста 15 дней, и продолжительность болезни, как правило, выше (3–5 дней), с более высоким числом особей, демонстрирующих подостро-хроническое течение заболевания. Кроме того, RHDV2 способен вызывать подобное ГБК заболевание у двух видов зайца: капского зайца (*Lepus capensis* var. *mediterraneus*) (Puggioni *et al.*, 2013) и итальянского зайца (*Lepus corsicanus*) (Camarda *et al.*, 2014).

Субклиническая хроническая форма ГБК характеризуется тяжелой, генерализованной желтухой, потерей веса и летаргией. Смерть может наступить через 1–2 недели, но некоторые кролики выживают после сероконверсии. Специфический и релевантный ответ в виде выработки IgM появляется в течение 3 дней, после чего следует появление IgA и IgG 2–3 днями позднее (Barbieri *et al.*, 1997). Вирусная РНК определяется посредством метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в течение 15 недель после инфицирования (Gall *et al.*, 2007) в крови и фекалиях выздоравливающих кроликов, а также у кроликов, инфицированных RHDV, но уже имевших защиту в виде приобретенных специфических антител (то есть, вакцинированных или ранее переболевших). На данный момент неизвестно, является ли это следствием медленного выведения вируса из организма или фактической длительной репликации вируса (персистенция).

По результатам серологических анализов на вирус ГБК (Carucci *et al.*, 1991; 1997; Collins *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 2000) было изолировано и частично охарактеризовано несколько непатогенных, родственных RHDV лаговировусов (кроличий калицивирус – RCV) в Европе и Океании (Carucci *et al.*, 1996; 1997; Forrester *et al.*, 2002; Marchandau *et al.*, 2005; Strive *et al.*, 2009; White *et al.*, 2004). Указанные «кишечные вирусы» вызывают серологический ответ, который может затруднять серологическую диагностику ГБК (Carucci *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 2000; Marchandau *et al.*, 2005; Nagesha *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2002).

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1: Методы анализа для диагностики геморрагической болезни кроликов и их назначение

| Метод | Назначение | | | | | |
|--|-------------------------------|---|---|-----------------------------------|--|---|
| | Отсутствие вируса в популяции | Отсутствие вируса у отдельного животного перед перемещением | Роль в программах борьбы с заболеванием | Подтверждение клинических случаев | Распространенность инфекции (эпиднадзор) | Иммунный статус отдельного животного или популяции (после вакцинации) |
| Идентификация возбудителя¹ | | | | | | |
| Выявление антигена | + | – | ++ | +++ | + | – |
| ОТ-ПЦР в реальном времени | + | – | ++ | +++ | + | – |
| Выявление иммунного ответа | | | | | | |
| ИФА | +++ | +++ | +++ | – | +++ | +++ |
| РГА | ++ | ++ | ++ | – | ++ | ++ |

Условные обозначения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = пригодный метод; + = возможно использование в некоторых случаях, но затраты, надежность или иные факторы существенно ограничивают его применение; – = неприменим для данной цели; н/п = неприменим.

Несмотря на то, что не все методы, перечисленные в категориях +++ и ++, прошли официальную валидацию, установившаяся практика их использования, а также тот факт, что они широко применяются, не давая при этом сомнительных результатов, определяют их приемлемость. ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИФА = иммуноферментный анализ; РВН = реакция нейтрализации вируса; РГА = реакция гемагглютинации.

1. Идентификация возбудителя

Самые высокие титры вируса обнаруживаются в печени (от 10^3 LD₅₀ [средняя летальная доза] до $10^{6,5}$ LD₅₀ /мл 10% гомогената), поэтому для идентификации как RHDV, так и EBHSV предпочтительно использовать материал печени. Концентрация вируса в других частях тела животного прямо пропорциональна васкуляризации, следовательно, селезенка также может быть полезна, а сыворотка может служить альтернативным диагностическим материалом. 3

У животных, умерших от подострой или хронической формы ГБК, образование антител запускает механизм клиренса вируса в печени и селезенке, поэтому вместо RHDV обнаруживаются частицы, подобные вирусу ГБК, главным образом, в селезенке, но также в печени (Barbieri *et al.*, 1997; Carucci *et al.*, 1991; Granzow *et al.*, 1996). Данные вирусоподобные частицы (ВПЧ) характеризуются отсутствием внешней оболочки капсида, состоящей из половины С-терминальной части VP60, и, как следствие, дают отрицательный результат при анализе с применением реакции агглютинации или моноклональных антител к RHDV, специфических к внешним конформационным эпитопам (Carucci *et al.*, 1995).

Предварительная обработка диагностических образцов практически одинакова для всех применяемых диагностических методов, за исключением метода иммуоокрашивания. Фрагмент органа механически гомогенизируют в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), рН 7,2–7,4, из расчета 5–20% материала (вес/объем), фильтруют через марлю и очищают центрифугированием при 5 000 *g* в течение 15 минут. На этой стадии супернатант можно исследовать при помощи РГА или иммуноферментного анализа (ИФА). Если образец предназначен для исследования под электронным микроскопом, то перед окончательным ультрацентрифугированием рекомендуется осуществить повторное центрифугирование при 12 000 *g* в течение 15 минут. Для определения методом ПЦР, РНК вируса также может быть напрямую извлечена из тканей. Учитывая высокую концентрацию RHDV в содержащих вирус образцах и высокую аналитическую чувствительность методов ПЦР, необходимо принять меры предосторожности на этапе подготовки образцов, чтобы избежать проблемы перекрестного загрязнения материалов.

1.1. Иммуноферментный анализ

Выявление вируса при помощи ИФА осуществляется с применением «сэндвич»-метода, который имеет несколько вариантов. Одна из процедур предусматривает использование реагентов, растворов, временного графика и температур, аналогичных применяемым в ходе конкурентного ИФА (К-ИФА) для целей серологического исследования (см. Раздел В.2.2). Следует использовать микропланшет с высокой степенью адсорбции. Гомогенат печени представляет собой 10% (вес/объем) суспензию в стандартном ФСБ; стандартный объем, используемый на каждом этапе, составляет 50 мкл на лунку. Буфером для ИФА на всех этапах служит ФСБ с 1% экстрактом дрожжей (или бычьим сывороточным альбумином [БСА]) и 0,1% Tween 20, рН 7,4. Стадия инкубации продолжается 50–60 мин при 37°C с осторожным перемешиванием. После каждого

¹ Рекомендуется применение комбинации различных методов идентификации возбудителя для исследования одной и той же клинической пробы.

этапа необходимо промывать планшет три раза по 3–5 минут, используя для этой цели ФСБ с 0,05% Tween 20. В качестве контроля следует использовать гомогенат печени кроликов с положительным и отрицательным результатом на вирус ГБК. В состав конъюгата с пероксидазой хрена (HRPO) могут входить очищенные IgG специфической поликлональной сыворотки или моноклональные антитела (MAb) (см. Раздел В.2.2). Моноклональные антитела к RHDV производятся в нескольких лабораториях и могут использоваться вместо кроличьей поликлональной сыворотки. Также получены MAb, распознающие специфические эпитопы, экспрессируемые только разновидностями вируса ГБК RHDVa и RHDV2 (Carucci, pers. data; Le Gall-Reculé *et al.*, 2013).

Для типирования присутствующих в образцах вирусов ГБК (RHDV, RHDVa или RHDV2) посредством ИФА («сэндвич»-метод) рекомендуется исследовать каждый образец не менее чем в четырех повторных тестах, а затем использовать конъюгаты с HRPO, имеющие различную специфичность, то есть, моноклональные антитела, распознающие антигенные детерминанты, присутствующие на поверхности вируса и альтернативно экспрессируемые классическим штаммом, RHDVa и RHDV2, и пул моноклональных антител, распознающих внутренние эпитопы, которые могут выявить гладкие, деградированные ВПЧ, а также EBHSV. Описан альтернативный вариант ИФА методом «антигенной ловушки», использующий овечьи антитела к RHDV-Ig в качестве антитела-ловушки, и MAb для выявления RHDV (Collins *et al.*, 1996).

1.1.1. Процедура проведения анализа (пример)

В отношении этапов, для которых не приведено подробное описание, см. процедуру К-ИФА для целей серологического исследования (Раздел В.2.2).

- i) Покрывают планшет гипериммунной сывороткой, содержащей антитела к RHDV, гипериммунной сывороткой, содержащей антитела к RHDV2, и сывороткой, не содержащей антител к RHDV. Последняя служит в качестве контроля для неспецифических реакций (ложноположительные образцы). Для каждого образца восемь лунок сенсibiliзируют положительной сывороткой и четыре лунки – отрицательной.
- ii) Разводят экстракт печени в соотношении 1/5 и 1/30 (два повтора для каждого разведения) в буфере для ИФА (см. выше) непосредственно в лунках планшета (например, добавляют 45 мкл буфера во все лунки, добавляют 10 мкл образца в первые две лунки а затем, после встряхивания, переносят 9 мкл в следующие лунки). Положительный и отрицательный контроль подвергают тем же процедурам, что и образцы.
- iii) После инкубации и промывания (см. выше) инкубируют с конъюгатами специфических антител с HRPO.
- iv) После конечной серии промываний добавляют хромогенный субстрат. В качестве субстрата пероксидазы для развития реакции может быть использован ортофенилендиамин (OPD). Используют 0,15 М цитратно-фосфатный буфер, pH 5,0, с 0,5 мг/мл OPD и 0,02% H₂O₂. Реакцию прекращают через 5 минут добавлением 50 мкл 1М H₂SO₄.
- v) Измеряют поглощение при 492 нм. Положительными считаются образцы, для которых разница в поглощении между лунками, сенсibiliзированными RHDV-положительной сывороткой и лунками, сенсibiliзированными отрицательной сывороткой, составляет >0,3. Как правило, при разведении 1/30 величина поглощения для положительных образцов, взятых у кроликов с классической острой формой ГБК, составляет >0,8. Величина поглощения отрицательного образца при разведении 1/5 варьирует от 0,1 до 0,25.

Возможно применение данного RHDV-специфического ИФА, осуществляемого «сэндвич»-методом, для диагностики EBHSV, но, вследствие значительных антигенных различий между двумя указанными вирусами существует риск получения ложноотрицательных результатов. Как следствие, настоятельно рекомендована разработка EBHSV-специфического «сэндвич»-метода ИФА с применением вместо кроличьей сыворотки заячьей сыворотки, содержащей высокие титры антител к EBHSV, или перекрестно-реагирующих моноклональных антител к RHDV (Carucci *et al.*, 1991; 1995), или специфических моноклональных антител к EBHSV (Carucci *et al.*, 1991).

1.2. Методы распознавания нуклеиновых кислот

Согласно нескольким авторам (Gould *et al.*, 1997; Guittre *et al.*, 1995), вследствие низкого уровня вариативности нуклеотидной последовательности между изолятами RHDV и RHDVa и высокой чувствительности метода ПЦР, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) представляет собой идеальный способ экспресс-диагностики ГБК. Посредством данного метода исследуются образцы органического материала (оптимальный вариант – печени или селезенки), мочи, фекалий и сыворотки с использованием различных олигонуклеотидных праймеров, комплементарных капсидной области генома RHDV. В референтной лаборатории МЭБ по ГБК используется одностадийная ОТ-ПЦР с применением следующих праймеров, специфических для гена VP60: прямой: 5'-CCT-GTT-ACC- ATC-ACC-ATG-CC-3'; обратный: 5'-CAA-GTT-CCA-RTG-SCT-GTT-GCA-3". Данные праймеры способны амплифицировать все варианты RHDV, включая RHDV2. Для амплификации только RHDV2 необходимо использовать другие специфические праймеры, а именно, "14U1" (5'-GAA-TGT-GCT-TGA-GTT-YTG-GTA-3") и "RVP60-L1" (5'-CAA-GTC-CCA-GTC-CRA-TRA-A-3"), которые амплифицируют последовательность из 794 пар оснований, находящуюся в С-терминальной части гена, кодирующего VP60 вируса RHDV2 (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013). кДНК, получаемую в результате обратной транскрипции, как правило, амплифицируют в ПЦР согласно описанию (Guittre *et al.*, 1995) или с применением одностадийной стандартной методологии ОТ-ПЦР. Для обнаружения продукта ПЦР реакционная смесь с

амплифицированной ДНК подвергается электрофорезу в агарозном геле. При необходимости, секвенированием может быть установлена специфичность продукта ПЦР. Аналогичный ОТ-ПЦР метод был использован для идентификации непатогенного кроличьего калицивируса (RCV) (Carucci *et al.*, 1998). ОТ-ПЦР представляет собой крайне чувствительный метод обнаружения RHDV: его чувствительность, как минимум, в 10^4 раз выше, чем у ИФА (Guittre *et al.*, 1995). Он не строго обязателен для рутинной диагностики, но он чувствительнее, удобнее и требует меньше времени, чем другие тесты. Аналогичным образом ОТ-ПЦР для обнаружения EBHSV был применен для обнаружения и характеристики штаммов EBHSV (Le Gall-Reculé *et al.*, 2001).

В качестве следующего поколения диагностических инструментов для выявления вируса ГБК разработан метод мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени с внутренним контролем, использующий флуорогенный зонд TaqMan® и внешние стандарты для абсолютного количественного определения РНК (Gall *et al.*, 2007). В данном методе используются следующие олигонуклеотиды [VP60-7 прямой: 5'-ACY-TCA-CTG-AAC TYA-TTG-ACG-3', vp60-8 обратный: 5' TCA-GAC-ATA-AGA-AAA-GCC-ATT- GG-3'] и зонд [VP60-9 fam 5'-FAM-CCA-ARA-GCA-CRC-TCG-TGT-TCA-ACC-T-TAMRA-3']. Также разработан специфический метод ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием зонда TaqMan, предназначенный для обнаружения RHDV2 (Duarte *et al.*, 2015), в котором используются олигонуклеотиды [RHDV2-F: 5'-TGG-AAC-TTG-GCT-TGA-GTG-TTG-A-3', RHDV2-R: 5'-ACA-AGC-GTG-CTT-GTG-GAC-GG-3'] и зонд [RHDV2: 5'-FAM-TGT-CAG-AAC- TTG-TTG-ACA-TCC-GCC-C-TAMRA-3'].

1.3. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия негативно-окрашенных препаратов может проводиться так называемым «капельным методом». Сетку с формваровой/ угольной подложкой помещают на каплю полученной из тканей органа суспензии (приготовленной согласно описанию в Разделе В.1) и оставляют на 5 минут. После удаления излишков жидкости при помощи кончика листа фильтровальной бумаги, сетку помещают на каплю 2% фосфорновольфрамовокислого натрия (NaPT), pH 6,8, на 1,5 минуты. Излишки красителя удаляют и сетку исследуют при увеличении $\times 19-28\ 500$.

Учитывая более низкую чувствительность капельного метода, рекомендуется ультрацентрифугировать образцы, чтобы концентрировать вирусные частицы. Осадок, полученный после ультрацентрифугирования (минимум 100 000 *g* в течение 30 минут), ресуспендируют в ФСБ или в дистиллированной воде, на несколько минут помещают на сетку, а затем окрашивают согласно описанию. Вирионы ГБК выглядят как частицы, лишенные внешней оболочки, 32–35 нм в диаметре, с кольцеобразным капсидом (25–27 нм в диаметре), от которого лучеобразно расходятся десять коротких периферических отростков, расположенных через одинаковые промежутки. Гладкие (s-RHDV) частицы распознают по полной потере внешних частей, благодаря чему они становятся меньше по размеру и принимают форму шестиугольника, у которого видно только капсидное кольцо (Barbieri *et al.*, 1997; Carucci *et al.*, 1991; Granzow *et al.*, 1996).

Для диагностических целей и, в особенности, когда другие методы дают сомнительные результаты, лучшим методом электронной микроскопии является иммуноэлектронная микроскопия (IEM) (Lavazza *et al.*, 2015). Для целей данного метода используют гипериммунную сыворотку, содержащую антитела к RHDV, кроличью или других видов животных, или специфические моноклональные антитела, которые перед ультрацентрифугированием инкубируют с равным объемом образца в течение часа при 37°C. Иммунная реакция стимулирует образование агрегатов вирусных частиц, которые легко распознаются под электронным микроскопом. Для более точной идентификации вирионов и вирусных белков может быть применен также метод окрашивания золотом.

EBHSV также может быть идентифицирован в диагностируемых образцах методами электронной микроскопии. Кроме того, для идентификации EBHSV может применяться метод IEM с использованием реконвалесцентной сыворотки, содержащей антитела к EBHSV, или специфических к данному вирусу моноклональных антител. Используя антисыворотки, специфические к EBHSV и RHDV, можно дифференцировать два указанных вируса.

1.4. Реакция гемагглютинации (РГА)

РГА была первым тестом, использовавшимся в рутинной лабораторной диагностике ГБК (Lui *et al.*, 1984). Поскольку RHDV2 демонстрирует агглютинирующую активность, аналогичную RHDV/RHDVa (Le Gall-Reculé *et al.*, 2013), данный метод может быть использован также и для диагностики RHDV2. Для проведения реакции агглютинации требуются человеческие красные кровяные тельца 0 группы, свежесобранные, хранившиеся ночь в растворе Олсвера и промытые в 0,85% ФСБ с pH 6,5 (диапазон 6–7,2). При использовании красных кровяных телец (RBC) других видов РГА слабо выражена или отсутствует. Промытые красные кровяные тельца суспендируют в концентрации 0,75% в ФСБ. Двукратное разведение очищенного супернатанта 10% гомогената тканей печени или селезенки инкубируют с равным объемом промытых RBC в запечатанном круглодонном микротитрационном планшете, предпочтительно при 4°C в течение 1 часа (диапазон от 20 минут до 2 часов). Реакция считается положительной при наличии агглютинации в конечном разведении $>1/160$. Более низкие титры рассматриваются, как сомнительные, и подлежат проверке другими методами. Примерно для 10% образцов, дающих положительный результат при исследовании методами ИФА или электронной микроскопии, результат РГА отрицательный (ложноотрицательная РГА). Некоторые изоляты вируса ГБК могут демонстрировать зависимость от температуры различия в характеристиках гемагглютинации и проявлять агглютинирующую активность только когда тестирование осуществляется при 4°C. Тем не менее, ложноотрицательный результат РГА получают, главным образом, при анализе материала, взятого у кроликов с подострой/хронической формой заболевания, и он зависит от характеристик ВПЧ.

При исследовании органов зайцев методом РГА, направленным на выявление RHDV, значимые титры получают редко. Для демонстрации гемагглютинирующей активности в препаратах, полученных из органов кроликов, инфицированных EBHSV, следует применять модифицированный протокол исследования: все этапы осуществляют при 4°C, суспензию, полученную из органов, обрабатывают равным объемом хлороформа, и значение pH для красных кровяных телец не должно превышать 6,5 (Сарусси *et al.*, 1991). Однако даже при использовании указанной методики только около 50% образцов дают положительный результат. Это объясняется тем, что болезнь, поражающая зайцев, часто носит подострый или хронический характер и, следовательно, вирус имеет типичные антигенные и структурные характеристики ВПЧ (Сарусси *et al.*, 1991).

Вследствие практической сложности получения и хранения эритроцитов человека и риска, связанного с работой с такими клетками, а также из-за трудности получения достоверных результатов данный метод заменен методом ИФА.

1.5. Иммуноокрашивание

Образец ткани, зафиксированный в 10% забуференном формалине и заключенный в парафин, подвергают исследованию методом иммунного окрашивания с использованием комплекса авидин-биотин-пероксидаза (ABC). Срезы сначала депарафинируют в ксилоле или спирте, подвергают контр-окрашиванию гематоксилином в течение 1 минуты и ополаскивают водопроводной водой. Затем их помещают в ванночку с метанолом, содержащую 3% H₂O₂, и трижды промывают в фосфатно-буферном солевом растворе, каждый раз в течение 5 минут. Для уменьшения фоновых помех, вызываемых неспецифическим связыванием антител, образцы перед добавлением биотина инкубируют с сывороткой здоровых кроликов в течение 1 часа при комнатной температуре. Препараты инкубируют в течение ночи в камере влажности при комнатной температуре с биотинилированной сывороткой, содержащей антитела к вирусу ГБК, или с моноклональными антителами к вирусу ГБК, промывают, как описано выше, и вновь инкубируют в течение 30 минут при 37°C с авидин-биотин-пероксидазой. Затем препараты трижды промывают. В качестве субстрата используют аминоксилкарбазол. В завершение препараты ополаскивают водопроводной водой и исследуют (Stoerckle-Berger *et al.*, 1992).

Характерным и специфическим признаком является интенсивное окрашивание ядра и диффузное окрашивание цитоплазмы некротических клеток в печени, главным образом, в перипортальных областях. Также наблюдается положительное окрашивание макрофагов и клеток Купфера и гепатоцеллюлярные реакции. Положительная реакция может наблюдаться также для макрофагов в легких, селезенке и лимфатических узлах и в мезангиальных клетках почек (Stoerckle-Berger *et al.*, 1992).

Срезы из замороженных тканей, фиксированные метанолом, могут напрямую подвергаться 6 иммуноокрашиванию путем инкубирования в течение 1 часа с моноклональными антителами или антисывороткой к RHDV, конъюгированными с флуоресцеином. Специфическая флуоресценция наблюдается в образцах печени, селезенки и почечных клубочков.

1.6. Вестерн-блоттинг

Когда другие тесты, например, РГА или ИФА, дают вызывающие сомнения (слабоположительные) результаты, или существуют подозрения, что образцы содержат частицы s-RHDV, для постановки окончательного диагноза применяют вестерн-блоттинг.

Готовят гомогенаты, как описано ранее, и повышают концентрацию вирусных частиц (десятикратно) посредством ультрацентрифугирования (100 000 *g* в течение 90 минут) через 20% (вес/вес) сахарозную подушку.

Как супернатант, так и осадок могут быть использованы для обнаружения, соответственно, 6S-субъединиц RHDV (Сарусси *et al.*, 1995) и денатурированного структурного белка VP60 вируса ГБК или его протеолитических фрагментов, которые могут варьировать в размере от 50 до 28 кДа. В каждом случае должны присутствовать положительный и отрицательный контрольные образцы.

Обнаружение белков RHDV может производиться с использованием поликлональных или моноклональных антител (MAb). Если используются MAb, они должны распознавать секвенциальные эпитопы. Специфические MAb, распознающие внутренние или скрытые эпитопы, могут использоваться также для обнаружения EBHSV. Гипериммунные кроличьи сыворотки, содержащие антитела к RHDV, менее эффективны, чем MAb, при распознавании одних и тех же паттернов (Сарусси *et al.*, 1996).

Белки в образцах денатурируют в течение 2 минут при 100°C в присутствии 60 мМ Tris, pH 6,8, 2% додецилсульфата натрия (SDS), 2% β-меркаптоэтанола и 5% глицерина, разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 10% SDS, и затем переносят при помощи электроблоттинга на нитроцеллюлозные или поливинилденфторидные (PVDF) мембраны, в 25 мМ Tris, 192 мМ глицине с pH 8,3 и 20% (объем/объем) метаноле при 1,5 Å в течение 60 минут с охлаждением или при 0,15 Å в течение ночи. После переноса мембраны в течение 30-60 минут насыщают в блокирующем буфере или ФСБ, pH 7,4, содержащем 2% бычий сывороточный альбумин (БСА), после чего инкубируют 2 часа при комнатной температуре с соответствующим разведением сыворотки в ФСБ, pH 7,4, и 1% БСА. Фильтры тщательно промывают ФСБ и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре с антивидовыми иммуноглобулинами, мечеными щелочной фосфатазой, при разведении, предварительно установленном

титрованием. Затем фильтры еще раз промывают и добавляют хромогенный субстрат (5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат и нитросиний тетразолий).

Положительные анализируемые образцы и положительный контрольный образец будут давать паттерн, соответствующий реакции на белки с молекулярным весом, равным, соответственно, 60 кДа (одиночный структурный белок RHDV) или 41–28 кДа (фрагменты VP60, связанные с переходом от RHDV к s-RHDV) при исследовании осадка, и молекулярным весом, равным 6 кДа (субъединицы), при исследовании супернатанта.

Метод вестерн-блоттинга может применяться также для идентификации EBHSV. Протокол проведения исследования идентичен вышеприведенному. Паттерны полос белка, полученные с использованием поликлональной сыворотки, содержащей антитела к EBHSV, и с использованием перекрестно-реагирующих моноклональных антител к RHDV, аналогичны. Однако процент образцов, демонстрирующих признаки деградации вируса, выше, и, следовательно, часто наблюдается несколько имеющих более низкий молекулярный вес фрагментов, являющихся производными структурного белка VP60.

1.7. Инокуляция кроликам

Поскольку отсутствует эффективная система для размножения вирусов RHDV и EBHSV *in-vitro*, изоляция клеточных культур не может быть включена в число диагностических методов. Следовательно, инокуляция кроликам остается единственным способом изолирования, размножения и титрования инфекционности RHDV. Однако по этическим соображениям следует избегать применения данного метода для целей рутинной диагностики. В случае обоснованной необходимости применения данного метода, кролики должны быть полностью восприимчивы к вирусу, то есть, они должны быть старше 2 месяцев от роду и не иметь антител к RHDV (см. серологические методы). Размножение вируса ГБК осуществляется посредством внутримышечной, внутривенной или ороназальной инокуляции фильтрованных и обработанных антибиотиками суспензий тканей печени. После появления клинических проявлений заболевания признаки и посмертные поражения должны быть аналогичны наблюдаемым при естественном инфицировании. При использовании в качестве инокулята RHDV/RHDVa через 18 – 24 после заражения регистрируется рост температуры тела, после чего в 70-90% случаев следует гибель животного. Некоторые особи могут оставаться в живых до 6–8 дней после инфицирования. При исследовании *in-vivo* патогенности RHDV2 уровень смертности гораздо ниже (в среднем 20%), гибель животных наступает позже и в течение более продолжительного периода, чем в случае классических RHDV и RHDVa, а именно, через 3–9 дней после инокуляции и в течение 5 дней вместо 2–6 дней после инокуляции и в течение 3–4 дней, как обычно наблюдается в случае классических вирусов ГБК. У животных, перенесших заболевание, наблюдается только временная гипертермия, депрессия и анорексия, но присутствует сильнейшая сероконверсия, которую легко обнаружить на 3-4 день после заражения.

2. Серологические исследования

Заболевание, вызванное RHDV, может быть диагностировано посредством обнаружения иммунного ответа в виде образования специфических антител. Поскольку гуморальный ответ играет важнейшую роль в развитии у животных защиты от ГБК, определение титра специфических антител после вакцинации или у выздоравливающих животных носит прогностический характер в отношении способности кроликов противостоять заражению RHDV. Поскольку между RHDV/RHDVa и RHDV2 существуют антигенные различия, инфицирование или вакцинация гомологичной вакциной вызывают четко различающийся гуморальный иммунный ответ. Следовательно, серологическая диагностика должна основываться на методах, использующих специфические иммунологические реагенты для RHDV и RHDV2. Таким образом, особенно в случае отсутствия или ограниченности анамнестических или эпидемиологических данных, следует выполнить анализ на наличие как RHDV, так и RHDV2, и сравнить результаты.

Для серологической диагностики ГБК применяются три базовых метода: реакция торможения гемагглютинации (РТГА) (Lui *et al.*, 1984), непрямой ИФА (Н-ИФА) и К-ИФА (Carucci *et al.*, 1991). Каждый из указанных методов имеет свои преимущества и недостатки. С точки зрения доступности реагентов и уровня технической сложности выполнения анализа наиболее удобным методом является РТГА, далее следуют Н-ИФА и К-ИФА, соответственно. С другой стороны, оба варианта ИФА быстрее и проще, чем РТГА, особенно когда необходимо проанализировать большое количество образцов. Специфичность К-ИФА заметно выше, чем двух остальных методов (Carucci *et al.*, 1991). Описан альтернативный вариант К-ИФА (Collins *et al.*, 1995). Для повышения качества интерпретации результатов серологических методов и для корректного установления иммунологического статуса кроликов существует также комбинация методов ИФА, распознающих IgA, IgM и IgG (Cooke *et al.*, 2000).

Для исследования конкретных случаев, или если требуется более высокий уровень чувствительности, или для выявления антител, выработка которых обусловлена действием перекрестно-реагирующих непатогенных кроличьих калицивирусов (см. Раздел А. «Введение») могут использоваться другие, дополнительные, методы анализа (Carucci, неопубликованные данные; Cooke *et al.*, 2000), а именно:

- **Н-ИФА:** антиген (RHDV-положительный гомогенат печени) связывается с твердой фазой посредством моноклонального антитела, эпитоп которого расположен на внешней оболочке RHDV. Затем осуществляется серийное разведение сывороток, начиная с 1/40, и IgG, связанный с антигеном, распознается с использованием реагента, предпочтительно, моноклонального антитела к кроличьему IgG, меченного пероксидазой хрена. Данный вид ИФА имеет более высокую чувствительность, чем К-ИФА, делая возможным измерение содержания антител с высокой перекрестной реактивностью и обнаружение антител с низкой avidностью.

- **Твердофазный ИФА (ТФ-ИФА):** очищенный антиген адсорбируют непосредственно на твердой фазе, и вследствие деформации вируса экспонируются внутренние эпитопы. Таким образом, данный вид ИФА выявляет более широкий спектр антител к RHDV и имеет высокую чувствительность и низкую специфичность. По указанным причинам он может применяться также для серологического анализа на наличие EBHSV. Наряду с И-ИФА этот тест можно считать специфическим тестом на лаговирин, то есть, тестом, способным определять антитела к общим для лаговировусов эпитопам, присутствующим в NH₂-концевой части капсидного белка VP60.
- **«Сэндвич»-метод ИФА для определения IgM и IgG в образцах тканей печени или селезенки, уже исследованных вирусологическими методами:** такой тест особенно полезен в том случае, если животное погибло от хронической формы заболевания, когда обнаружение вируса при помощи РГА и ИФА может быть затруднительным. В таком случае высокий уровень IgM, специфических к RHDV, и низкий уровень (или отсутствие) IgG являются однозначными признаками ГБК.

2.1. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Антиген: препарат, содержащий антиген, готовят из печени инфицированного кролика, взятой сразу же после гибели животного. Печень гомогенизируют в ФСБ, pH 6,4, из расчета 10% материала (вес/объем) и очищают при помощи двух последовательных центрифугирований с низкой скоростью (500 **g** в течение 20 минут и 6000 **g** в течение 30 минут). Надосадочную жидкость, извлеченную из пробирки так, чтобы не затронуть поверхностный липидный слой, фильтруют через фильтровальный материал с размером пор = 0,22 мкм, титруют в РГА и разделяют на аликвоты, которые хранят при -70°C.

Образцы сывороток: Перед проведением анализа сыворотки инактивируют путем инкубирования при 56°C в течение 30 минут. Затем сыворотки обрабатывают 25% каолином (окончательное разведение сыворотки: 1/10) при 25°C в течение 20 минут и центрифугируют. Повторно обрабатывают каолином, также при 25°C в течение 20 минут, на этот раз с 1/10 объема примерно 50% эритроцитарной массы 0 группы. Красные кровяные тельца должны быть свежесобранные, хранившиеся ночь в растворе Олсвера и промытые в 0,85% ФСБ с pH 6,5. Сыворотки очищают центрифугированием.

2.1.1. Протокол исследования

- Вносят 50 мкл сыворотки в первую лунку круглодонного титрационного микропланшета и готовят двойные разведения в лунках 2–8, используя ФСБ с 0,05% БСА.
- Добавляют 25 мкл препарата антигена, содержащего 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) RHDV, в каждую лунку и инкубируют планшет при 25°C в течение 30–60 минут.
- Добавляют 25 мкл человеческих красных кровяных телец 0 группы в концентрации 2–3% в каждую лунку и дают отстояться при 25°C в течение 30–60 минут.
- Титруют антиген в каждом опыте, чтобы убедиться, что было использовано 8 ГАЕ/ 25 мкл, и включают положительную и отрицательную контрольную сыворотки.

Титр сыворотки это конечное разведение сыворотки, демонстрирующее торможение гемагглютинации. Положительный пороговый предел титров сыворотки коррелирует с титром отрицательной контрольной сыворотки; обычно он лежит в диапазоне 1/20–1/80.

Также как и в случае реакции гемагглютинации (РГА) (раздел В.1.4.), трудности, связанные с получением и работой с человеческими эритроцитами 0 группы, привели к вытеснению данного теста методами ИФА для обнаружения антител.

2.2. Конкурентный иммуноферментный анализ

Антиген: Как следствие недавнего обнаружения RHDV2, серологические анализы на ГБК сегодня должны основываться на использовании двух антигенов - классического RHDV и RHDV2.

Препарат антигена может быть приготовлен, как было описано ранее для метода РТГА (Раздел В.2.1), с обязательным хранением препарата при -20°C в присутствии глицерина из расчета 50% (объем/объем) для предотвращения замерзания. При необходимости, перед добавлением глицерина вирус можно инактивировать 1,0% бинарным этиленгликолем (ВЕГ) при 33°C в течение 24 часов. Антиген предварительно титруют в ИФА и затем используют в качестве лимитирующего реагента: то есть, разведения, которое соответствует 60–70% высоты плато (поглощение при 492 нм в интервале 1,1–1,3).

Сыворотка, содержащая антитела к RHDV: специфические поликлональные сыворотки с высоким титром антител к RHDV или RHDV2 могут быть получены различными способами. Ниже приведены два возможных метода, используемых в настоящее время:

- Кроликов инфицируют 10%-м RHDV-положительным экстрактом печени, разведенным в соотношении 1/100 в ФСБ для получения реконвалесцентной сыворотки (21–25 дней), содержащей высокий уровень IgG к RHDV. В случае RHDV, вследствие связанного с ним высокого уровня смертности, необходимо инфицировать не менее 10-15 серонегативных кроликов в возрасте старше 8 недель, или инфицировать кроликов, которые имеют лишь частичную защиту (например, 4–8 кроликов, инфицированных на 3 - 7 день

после вакцинации). У выживших после инфицирования животных через 21-25 дней после заражения производят отбор крови для получения реконвалесцентной сыворотки (титр в К-ИФА около 1/10240). В качестве альтернативы, переболевших кроликов подвергают повторному заражению через 3-4 месяца после инфицирования и через 10-15 дней производят отбор крови для получения гипериммунной сыворотки к RHDV. В случае RHDV2 основная трудность состоит в том, что титр антител в сыворотке инфицированных реконвалесцентных животных часто в 20-40 раз ниже, чем титр антител, образование которых вызвано присутствием RHDV, предположительно, вследствие низкого уровня смертности, связанного с RHDV2. Таким образом, как и в предыдущем случае, для экспериментального инфицирования должно быть использовано не менее 10-15 серонегативных кроликов.

- ii) Подвергают очистке антиген (RHDV или RHDV2), полученный из печени экспериментально инфицированных кроликов, умерших от острой формы заболевания (через 28 - 40 часов после инфицирования), используя один из опубликованных методов (Carucci *et al.*, 1991; 1995; Ohlinger *et al.*, 1990). Затем очищенный RHDV с масляным адьювантом может использоваться для иммунизации овец или коз в соответствии с классическим протоколом. Аналогичная процедура может применяться для инокуляции кроликов, если очищенный препарат вируса перед инокуляцией инактивировать.

Вместо поликлональной кроличьей сыворотки могут использоваться моноклональные антитела к RHDV. Очистка кроличьих IgG и конъюгация с пероксидазой хрена (HRPO) производятся в соответствии со стандартными протоколами. Конъюгированные антитела титруют в ИФА («сэндвич»-метод) в присутствии и в отсутствие антигена (RHDV) (препарат печени вирус-отрицательного кролика). Затем конъюгат используют в наибольшем разведении, дающем максимальное (высота плато) поглощение (если сыворотка имела хороший титр антител к RHDV, значение поглощения для конъюгата с HRPO должно находиться в интервале от 1/1000 до 1/3000).

Контрольные сыворотки: Отрицательную сыворотку получают из материала, взятого у кроликов, полностью восприимчивых к RHDV. В качестве положительной сыворотки используют либо реконвалесцентную сыворотку, разведенную 1/100 в отрицательной сыворотке, либо сыворотку вакцинированного животного.

2.2.1. Протокол исследования (пример)

Примечание: настоящий протокол действителен также в отношении RHDV2 при условии использования гомологичных реагентов.

- i) Кроличью сыворотку, содержащую антитела к RHDV, разведенную до предварительно установленного титра, например, 1/5000, в 0,05 М карбонатном/ бикарбонатном буфере, pH 9,6, помещают на ночь на микропланшет для ИФА с высокой степенью связывания (например, Nunc Maxisorb Immunoplate) при 4°C.
- ii) Промывают планшет три раза, по 3-5 минут каждый, в ФСБТ (ФСБ, pH 7,4, с 0,05% Tween 20). Если планшеты не используются незамедлительно, их можно хранить в закрытых пластиковых пакетах в течение месяца при -20°C.
- iii) Во все используемые лунки планшета (см. ниже) помещают по 25 мкл ФСБТ с 1% экстрактом дрожжей (ФСБТД) или с 1% БСА (ФСБТ-БСА). Добавляют 7 мкл первого образца сыворотки в первые две лунки (A1 и B1), 7 мкл второго образца сыворотки в две следующие лунки (C1 и D1), аналогичным образом поступают с третьим (E1 и F1) и четвертым (G1 и H1) образцами сыворотки, заполнив, таким образом, первый столбец лунок. Если требуется получить качественные данные (положительный/отрицательный результат), повторяют операцию, заполняя второй столбец образцами сыворотки с 5 по 8, третий столбец – образцами сыворотки с 9 по 12, и так далее. Если требуется определить титр сыворотки, она подлежит дальнейшему разведению. Планшет встряхивают и затем при помощи 8-канальной микропипетки переносят 7 мкл из лунок первого столбца в лунки 2 столбца. Это соответствует четырехкратному разведению сывороток. Последнюю операцию можно повторить один раз (титр 1/160), дважды (титр 1/640), или четыре раза (титр 1/10 240). Как для качественного анализа сывороток (одно разведение), так и для получения конечного титра (несколько разведений), на каждом планшете оставляют 12 свободных лунок для контрольных сывороток. Добавляют 7 мкл положительной сыворотки в лунки G7 и H7, и 7 мкл отрицательной сыворотки в лунки G10 и H10, и затем разбавляют их один и два раза (1/40–1/160).
- iv) Добавляют в каждую лунку планшета 25 мкл антигена, суспендированного в ФСБТД, в разведении, вдвое превышающем заданное, как описано выше в разделе «Антиген» (см. первую часть описания данного метода ИФА).
- v) Инкубируют планшет при 37°C на качающейся платформе в течение 50–60 минут.
- vi) Промывают планшет как описано в пункте ii.
- vii) Добавляют в каждую лунку 50 мкл кроличьих IgG к RHDV, конъюгированных с пероксидазой хрена, в заданном разведении, как описано выше в разделе «Сыворотка, содержащая антитела к RHDV» (см. первую часть описания данного метода ИФА).
- viii) Инкубируют планшет при 37°C на качающейся платформе в течение 50–60 минут и промывают, как описано в пункте ii, добавив четвертое промывание продолжительностью 3 минуты.
- ix) Используют для каждой лунки 50 мкл орто-фенилендиамина (OPD) в качестве донора водорода при следующих условиях: 0,5 мг/мл OPD в 0,15 М фосфатном/цитратном буфере, pH 5, и 0,02% H₂O₂.

x) Прекращают реакцию через 5 минут добавлением в каждую лунку 50 мкл 1 М H₂SO₄.

xi) Считывают планшет при помощи спектрофотометра с фильтром 492 нм.

Сыворотка считается отрицательной, если величина поглощения для первого разведения (1/10) уменьшается менее, чем на 15%, в сравнении с референтным значением (разведение 1/10 отрицательной контрольной сыворотки), и положительной, если величина поглощения уменьшается на 25% или более. Если уменьшение величины поглощения для разведения 1/10 лежит в интервале от 15% до 25% в сравнении с референтным значением, то сыворотка считается сомнительной.

Титр сыворотки соответствует разведению, величина поглощения которого составляет 50% (±10) среднего значения трех разведений отрицательной сыворотки. Доказано, что это значение действительно также для определения RHDV2 методом К-ИФА.

В зависимости от источника сыворотки, обнаруживается широкий спектр титров: для реконвалесцентных кроликов положительные сыворотки лежат в интервале 1/640 - 1/10 240; для вакцинированных кроликов - в интервале 1/80 - 1/640; и для «непатогенной» инфекции - в интервале 1/10 - 1/160. Зная происхождение образца, можно сделать выбор между анализом одного или более разведений. Анализ только первого разведения позволяет определить, является сыворотка положительной или отрицательной. Титр устанавливают, тестируя все разведения, вплоть до шестого.

Вследствие существенных антигенных различий между RHDV и EBHSV (Capucci *et al.*, 1991; Stoerckle-Berger *et al.*, 1992), вышеописанные методы серологического исследования, в которых в качестве антигена используется RHDV, не рекомендованы для серологической диагностики синдрома европейского зайца-русака. Однако можно применять прямой ИФА для установления того, является ли заячья сыворотка положительной или отрицательной в отношении EBHSV; фактически, адсорбция RHDV на твердой фазе микропланшета для ИФА приводит к экспозиции перекрестно-реактивных антигенных детерминант. В качестве альтернативы, аналогичным образом может быть проведен EBHSV-специфический К-ИФА с использованием специфических реагентов (антиген и антисыворотка), приготовленных, как описано выше для RHDV.

2.3. Изотипный ИФА (изо-ИФА)

Данный метод ИФА позволяет определять и титровать изотипы IgA, IgM и IgG. Титры изотипов имеют критически важное значение для интерпретации полевых серологических данных в четырех основных областях: перекрестно-реагирующие антитела, естественная сопротивляемость молодых кроликов, материнские антитела и антитела у ранее инфицированных кроликов (Cooke *et al.*, 2000). Фактически, в случае пассивных антител определяются только IgG. У вакцинированных животных не определяются IgA, а у недавно инфицированных кроликов определяются сначала IgM, а затем IgA и IgG (Cooke *et al.*, 2000).

Для выявления иммуноглобулинов класса G (IgG), специфических к RHDV, один вид специфических к RHDV моноклональных антител адсорбируют на планшете Maxisorp в концентрации 2 мкг/мл методом, описанным выше для поликлональной сыворотки в К-ИФА (см. раздел В.2.2, протокол исследования, пункт i). Вирус добавляют на планшеты в концентрации, вдвое превышающей концентрацию, используемую в К-ИФА, и после инкубации и промывания. Сыворотки добавляют и серийно разводят четырехкратно, начиная с 1/40. Для обнаружения IgG, связанных с вирусом, используют конъюгат пероксидазы хрена с моноклональными антителами к кроличьим IgG. Конечный этап изо-ИФА, предназначенного для определения IgG, IgM и IgA, состоит в добавлении OPD и H₂SO₄ аналогично К-ИФА. Для обнаружения изотипов IgM и IgA этапы реакции ИФА инвертируют с целью избежать конкуренции с IgG, который, как правило, является преобладающим изотипом. MAб к кроличьим IgM или IgA помещают в лунки, и затем разводят сыворотки, как описано выше. Далее следует инкубация с антигеном, а затем используют конъюгат HRPO с MAб для определения связанного с планшетом RHDV. Сыворотка считается положительной, если значение ОП₄₉₂ (оптическая плотность) для разведения 1/40 превышает на 0,2 единицы оптической плотности (два стандартных отклонения) значение ОП для отрицательной сыворотки, используемой в качестве контроля. За титр каждой сыворотки принимается наибольшее разведение, дающее положительное значение. Поскольку тесты с применением изо-ИФА не следуют идентичной методике, эквивалентные титры не означают присутствие изотипов в одних и тех же количествах. Этот метод может применяться также для серологического исследования на антитела к RHDV2, естественно, с использованием специфических моноклональных антител к RHDV2.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общие сведения

1.1. Обоснование и предполагаемое использование продукта

В странах, где геморрагическая болезнь кроликов широко распространена, непрямой контроль заболевания у животных, содержащихся на фермах, и у домашних кроликов достигается при помощи вакцинации с использованием соответствующего типа вакцины, произведенного из очищенной суспензии тканей печени экспериментально инфицированных кроликов, инактивированной и содержащей адъювант. Методы инактивации

(формальдегид, бета-пропиолактон и другие соединения) и адъюванты (неполное минеральное масло или гидроксид алюминия) могут варьировать в соответствии с протоколом, используемым разными производителями. Уровень перекрестного иммунитета, создаваемый вакцинами против RHDV/RHDVa в отношении RHDV2, невелик и не предотвращает заражение и потери в результате клинического заболевания. Следовательно, настоятельно рекомендуется комбинированная вакцинация с использованием обоих типов антигенов или применение вакцины, гомологичной штамму вируса ГБК, идентифицированному в ходе эпидемии или вспышки заболевания.

Большинство производителей вакцин рекомендует одну базовую вакцинацию с ревакцинацией через год. Как правило, доза в 1мл вводится подкожно в область шеи, или внутримышечно. Первая инъекция проводится в возрасте 2-3 месяцев. В хозяйствах, где случаев болезни не наблюдалось, с отрицательными результатами серологических исследований на антитела к вирусу ГБК, рекомендуется вакцинировать только племенное поголовье. Учитывая высокие темпы пополнения поголовья в промышленных кролиководческих хозяйствах, стандартная программа вакцинирования предусматривает введение вакцины всем племенным животным, независимо от возраста, каждые 6 месяцев. Это означает, что все животные проходят вакцинацию, по меньшей мере, раз в год. Для обеспечения достаточного уровня защиты настоятельно рекомендуется ревакцинация, хотя экспериментальные данные показывают, что иммунитет обычно сохраняется в течение длительного времени (свыше 1года).

Учитывая короткий жизненный цикл (примерно 80 дней) животных, находящихся на откорме, и имеющуюся у них до возраста 6-8 недель естественную сопротивляемость заболеванию, вызываемому RHDV/RHDVa, но не заболеванию, вызываемому RHDV2, в вакцинации таких животных нет необходимости при условии нормальной ситуации на ферме, то есть, при наличии надлежащих мер биобезопасности и отсутствии вспышек заболевания на территории. После вспышки ГБК, особенно, если возбудителем является RHDV2, который может вызывать заболевание даже у молодых животных, даже при наличии действующих строгих санитарно-гигиенических мер, включая чистку и дезинфекцию, безопасную утилизацию туш и интервал перед пополнением поголовья, настоятельно рекомендуется вакцинировать мясных животных в возрасте 30–40 дней, поскольку частота случаев повторного заражения очень высока. Прекращать вакцинацию мясных животных целесообразно только по прошествии нескольких производственных циклов. Чтобы проверить, сохраняется ли в хозяйстве присутствие патогенных вирусов ГБК, оставляют невакцинированными некоторое количество кроликов, начиная с небольшой сигнальной группы.

Учитывая, что иммунитет возникает примерно через 7-10 дней, вакцинация может рассматриваться также в качестве эффективной постконтактной профилактики. В частности, в некоторых ситуациях вакцинация может быть включена в стратегии экстренного реагирования, применяемые в случаях обнаружения ГБК на фермах, где животные содержатся в отдельных помещениях и где на регулярной основе применяются надлежащие меры биобезопасности. Действительно, наилучшие результаты в том, что касается ограничения распространения 11 заболевания и снижения экономических потерь, могут быть получены при помощи сывороточной терапии путем парентерального введения гипериммунной сыворотки к RHDV, которая обеспечивает быстро возникающую, но кратковременную защиту против вируса ГБК. В обеих ситуациях (вакцинация с последующей постконтактной профилактикой и пассивный иммунитет в результате введения гипериммунных сывороток), необходимо использовать вакцину и сыворотки, гомологичные штамму вируса ГБК, вызвавшему вспышку заболевания. Это в особенности справедливо в случае RHDV2, учитывая слабый перекрестный иммунитет, обеспечиваемый классическими вакцинами на основе RHDV/RHDVa.

Вакцину следует хранить при температуре 2–8°C, но не в замороженном состоянии, и не подвергать воздействию яркого света или высоких температур.

2. Общая информация по производству вакцин и минимальные требования к стандартным вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

В настоящее время культивирование вируса ГБК возможно только путем инфицирования восприимчивых к вирусу животных. Таким образом, источником посевного вирусного материала для производства инактивированных тканевых вакцин служит гомогенат печени инфицированных животных, полученный посредством серийных пассажей на кроликах, которым вводят частично очищенную суспензию вируса ГБК. Кроликов для инокуляции отбирают из колоний, в которых результаты периодически проводимых серологических исследований подтверждают отсутствие данного заболевания и наличие восприимчивости к нему. Более сложным процессом является получение материала печени для изготовления вакцины против RHDV2 вследствие более низкого уровня смертности, регистрируемого в ходе экспериментального инфицирования.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних веществ)

Частично очищенную суспензию вируса ГБК получают центрифугированием суспензии печени в ФСБ (1/5 (вес/объем)) при 10 000 **g** в течение 20 минут при 4°C. Полученный супернатант обрабатывают 8% (объем/объем) полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000) в течение ночи при 4°C. Осадок ресуспендируют разбавлением 1/10 в ФСБ, и затем центрифугируют при 10 000 **g** в течение 20 минут при 4°C. Супернатант

ультрацентрифугируют при

80 000 **g** 2 часа при 4°C, используя 20% сахарозную подушку. Осадок ресуспендируют в ФСБ (1/100 исходного объема).

Далее осуществляют характеризацию полученной вирусной суспензии при помощи трех методов: электронной микроскопии негативно окрашенных препаратов, определения реактивности в ИФА с использованием различных специфических моноклональных антител, и активности гемагглютинации при комнатной температуре (титр гемагглютининов к человеческим эритроцитам 0 группы выше 1/1 280).

Отсутствие жизнеспособных бактерий, грибов или микоплазмы устанавливается с использованием общепринятых лабораторных бактериологических методов. Обнаружение конкретных инородных вирусов (например, вируса миксомы) может осуществляться методом ПЦР.

Контроль посевного вирусного материала осуществляется посредством прямого введения восприимчивым к вирусу кроликам, после чего производится оценка клинических признаков в ходе экспериментально вызванного заболевания. Посевной вирусный материал надлежащего качества должен вызывать у животных в течение 24-96 часов после инокуляции смертность различного уровня, в зависимости от типа вирусного штамма, то есть, 70–80% кроликов в случае RHDV/RHDVa и более низкий уровень в случае RHDV2 (в среднем 20%), при этом должны наблюдаться характерные для ГБК поражения внутренних органов. Для проверки результатов теста проводят макроскопическое и гистопатологическое исследование всех кроликов с целью исключить наличие интеркуррентного заболевания.

Посевной вирусный материал перед использованием титруют: он должен содержать не менее 10⁵ LD₅₀. Посевной материал хранят в замороженном состоянии (-70°C), лучше с добавлением глицерина 1:1 по объему, или лиофилизированным.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Процесс производства вакцины для обоих типов антигенов (RHDV и RHDV2) следует одному и тому же протоколу. После введения вируса восприимчивым кроликам, отбирают печень и селезенку от животных, умерших в период между 24 и 96 часами после инокуляции. Органы кроликов, погибших позднее, не отбирают. Органы измельчают в стерильном ФСБ (1/10 (вес/объем)), pH 7,2–7,4, и смесь гомогенизируют в течение 10 минут в блендере при охлаждении. Затем смесь обрабатывают 2% хлороформом (18 часов при 4°C), центрифугируют при 6 000 **g** в течение 1 часа при 4°C. Надосадочную жидкость собирают непрерывным откачиванием под высоким давлением и инактивируют. Содержащую вирус суспензию исследуют методами РГА и ИФА и, поскольку количество гемагглютинирующих единиц известно по результатам исходного титрования, добавляют стерильный ФСБ в объеме, достаточном для получения после инактивации и адсорбции/добавления адъюванта концентрации, равной 640–1280 гемагглютинирующих единиц/мл, в коммерческом продукте. Свою эффективность в подавлении инфицирующей способности вируса доказали многие вещества. Наиболее часто применяются формальдегид и бета-пропиолактон, которые могут использоваться в различных концентрациях и при различных температурах, в течение различных периодов времени и в сочетании друг с другом. В ходе инактивации рекомендуется непрерывно встряхивать жидкость. Затем в вакцину в качестве адъюванта добавляют гидроксид алюминия, неполный адъювант Фрейнда или иную масляную эмульсию. В конце добавляют консервант – тиомерсал (мертиолят) в разведении 1/10 000 (объем/объем) и разливают вакцину в ампулы.

12

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Поскольку культивирование вируса *in vitro* невозможно, единственными требованиями являются те, которые касаются инфицируемых животных. Кролики должны быть свободны от RHDV и вируса миксоматоза и не должны иметь антител к RHDV, включая перекрестно-реагирующие антитела, появление которых вызвано действием родственных RHDV непатогенных кроличьих калицивирусов (RCV).

Кролики (в возрасте не моложе 4 месяцев) по прибытии должны быть помещены на строгий карантин, в отдельном помещении, и содержаться в условиях, достаточных для обеспечения биобезопасности и удовлетворительного состояния здоровья животных (см. «Помещения для лабораторных животных», глава 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: стандарт контроля биологической опасности в ветеринарной лаборатории и вивариях).

В основе культивирования вирусного посевного материала и производства партий вакцины лежит один и тот же протокол экспериментального инфицирования, предусматривающий внутримышечную инъекцию дозы не менее 100 LD₅₀.

2.2.3. Технологический контроль

i) Содержание антигена

Титр RHDV определяется до инактивации путем вычисления гемагглютинирующего титра, который должен быть выше 1/1280, и реактивности в ИФА. Обе величины вновь определяют после инактивации и

адсорбции/добавления адьюванта. Тожественность вируса ГБК подтверждают посредством электронной микроскопии негативно окрашенных препаратов.

ii) Стерильность

Органы проверяют на наличие жизнеспособных бактерий, вирусов, грибов и микоплазмы в соответствии с протоколом, используемым для проверки исходного посевного вирусного материала. Раствор ФСБ и гель гидроксида алюминия стерилизуют в автоклаве, масляную эмульсию стерилизуют нагреванием при 160°C в течение 1 часа.

iii) Инактивация

Перед введением адьюванта необходимо убедиться в том, что инактивирующий агент вызвал инактивацию вакцинного вируса в ходе соответствующего процесса, проведенного с соблюдением производственных условий. Для данной цели тестированию подвергается каждая партия полученного активного вещества и готовый продукт.

Тридцать взрослых кроликов (>4 месяцев) делят на три группы по 10 особей. Первой и второй группам вводят концентрированный антиген и наблюдают в течение 15 и 7 дней, соответственно. Вторую группу через 7 дней умерщвляют с соблюдением принципов ветеринарной этики. Третьей группе вводят препарат печени кроликов второй группы и наблюдают в течение 21 дня. Доза парентерально (внутримышечно или подкожно) вводимого инокулята составляет 1 мл концентрированного антигена (преципитация ПЭГ), соответствующая, как минимум, 10 дозам (ГА $\geq 20\ 480$). Период наблюдения: 10 кроликов в течение 7 дней, 10 кроликов в течение 15 дней и 10 кроликов в течение 21 дня. Все кролики, находящиеся под наблюдением, должны выжить без появления каких-либо клинических симптомов. Препарат печени должен показывать отрицательный результат при исследовании методами РГА и «сэндвич»-ИФА. У кроликов, которым введен антиген, должен наблюдаться положительный серологический титр (например >1/80 по результатам К-ИФА для антител, специфических к гомологичному вирусу). Результаты серологического исследования животных, которым введен препарат печени, полученный после первого пассажа, должны быть отрицательными.

2.2.4. Анализ партии готового продукта

Каждую партию готовой вакцины проверяют на стерильность, безвредность и специфическую активность. Исследование продолжительности иммунитета проводят однократно с использованием типовой партии вакцины, тест на стабильность проводят с участием трех партий вакцины.

i) Стерильность/чистота

Каждая партия вакцины должна пройти проверку на наличие жизнеспособных бактерий, вирусов, грибов и микоплазмы в соответствии с тем же протоколом, который рекомендован для проверки исходного посевного вирусного материала.

iii) Безвредность

Перед проведением полевых испытаний безвредность новой вакцины проверяют в ходе лабораторных исследований. Должны быть проведены, в частности, следующие тесты на безвредность вакцины:

- a) Безвредность введения однократной дозы;
- b) Безвредность передозировки (как минимум, две дозы инактивированной вакцины);
- c) Безвредность повторного введения однократной дозы.

Тест проводится для каждого разрешенного способа введения. Используют не менее 10 взрослых кроликов (>4 месяцев), у которых отсутствуют антитела к RHDV. Животных наблюдают в течение 21 дня, производя оценку следующих параметров: общее состояние и реакции, чувствительность, пищевое поведение, характеристики фекалий, местные аномальные реакции в месте инокуляции. Регистрируют температуру тела за день до вакцинации, на момент вакцинации, через 4 часа после вакцинации и затем ежедневно в течение 4 дней. Отмечают максимальный подъем температуры для каждого животного. Не должно наблюдаться отклоняющихся от нормы местных или системных реакций; средний подъем температуры не должен превышать 1°C, и ни у одного животного температура не должна повышаться больше чем на 2°C. Допускается местная реакция продолжительностью не более 21 дней. Если применение вакцины разрешено для беременных кроликов, вакцину вводят не менее 10 беременным самкам в соответствии с рекомендованным графиком. Продолжают наблюдение до первого дня после родов. Крольчихи должны оставаться здоровыми, не допускается наличие отклоняющихся от нормы местных или системных реакций. Не должно наблюдаться нежелательного воздействия на беременность или на рожденное потомство.

iii) Специфическая активность партии

Используют восприимчивых к вирусу взрослых кроликов (>4 месяцев), не имеющих антител к RHDV и содержащихся в условиях надлежащей изоляции, гарантирующих отсутствие контакта с вирусом. Десяти кроликам вводят одну полную дозу вакцины, используя рекомендованный способ инокуляции. Две другие группы по пять кроликов в каждой вакцинируют 1/4 и 1/16 полной дозы, соответственно. Четвертая группа

невакцинированных животных служит в качестве контроля. Не менее, чем через 21 день после вакцинации проводят контрольное заражение всех кроликов, вводя внутримышечно дозу RHDV, которая содержит не менее 100 LD₅₀, или гемагглютинирующий титр которой превышает 1/2560. Наблюдают за кроликами еще 21 день. Результаты теста недействительны, если: а) в период между вакцинацией и контрольным заражением более 10% вакцинированных кроликов или более 20% кроликов контрольной группы демонстрируют отклоняющиеся от нормы клинические признаки или погибают по причинам, не связанным с употреблением вакцины; б) после контрольного заражения вирусом RHDV/RHDVa менее 70% кроликов контрольной группы погибает, имея типичные симптомы ГБК; или с) после контрольного заражения вирусом менее 10% кроликов контрольной группы погибает и менее 70% из них имеют высокие титры антител (>1/1280 по результатам гомологичного К-ИФА). Вакцина считается успешно прошедшей испытания, если: а) не менее чем у 90% вакцинированных кроликов не наблюдается никаких признаков ГБК; б) средний уровень антител у вакцинированных животных не уступает значительно уровню, зарегистрированному в ходе теста на защитные антитела, в котором роль вакцины выполняет инактивированный посевной вирусный материал.

2.3. Требования для получения разрешения

Тесты на безвредность, специфическую активность и стерильность готового продукта должны проводиться после розлива и упаковки. Поэтому на двух указанных завершающих этапах производства важно соблюдение стандартизованных процедур надлежащей производственной практики. Испытания проводятся с участием образцов, отобранных из статистически установленного числа случайно выбранных многодозовых контейнеров (20, 50 или 100 доз вакцины).

2.3.1. Требования в отношении безвредности

i) Безопасность для целевых и нецелевых видов животных

Кролики являются единственным видом, чувствительным к RHDV, и, согласно принципу гуманного обращения с животными, тесты и испытания должны проводиться исключительно с участием особей целевого вида животных. Соответствие требованиям безвредности готового продукта для кроликов должно быть подтверждено в ходе полевых испытаний с участием как откормочных, так и племенных животных. Отбирают не менее 30 племенных кроликов в возрасте старше 4 месяцев и 70 кроликов в возрасте 30–45 дней. Племенным кроликам вводят вакцину подкожно в заднюю часть шеи дважды (с интервалом в 3 недели), каждый раз по одной дозе. Кроликов, находящихся на откорме, вакцинируют в возрасте 30 дней или в возрасте 45 дней. Животных наблюдают в течение 4 месяцев после первой вакцинации. В качестве контроля служат невакцинированные животные.

Проверка безвредности вакцины для племенных кроликов осуществляется путем оценки их репродуктивной способности. Учитываются следующие параметры: местные или генерализованные реакции, общее количество родившихся и количество выживших крольчат, уровень смертности на момент отлучения от матери, средний вес молодых кроликов в период после отлучения от матери, ежедневное потребление пищи. Контроль безвредности вакцины для откормочных животных осуществляется путем ежедневной оценки состояния здоровья животных. Учитываются следующие параметры: местные или генерализованные реакции, индивидуальное увеличение веса, начиная с момента отлучения от матери (30 дней) и каждые 15 дней, ежедневное потребление пищи, коэффициент конверсии, уровень смертности в период откорма. У вакцинированных кроликов на всем протяжении исследований не должно наблюдаться никаких изменений общего состояния здоровья или появления отклоняющихся от нормы местных или системных реакций.

Вакцина не должна содержать никаких ингредиентов, которые могут представлять риск для потребителей мяса вакцинированных кроликов. Однако, поскольку инактивированная вакцина содержит в качестве адъюванта минеральное масло, существует сопутствующий риск в случае случайного самоинъектирования. Случайная инъекция может вызвать сильное вздутие и тяжелые последствия, если немедленно не обратиться к врачу.

ii) Повышение вирулентности для аттенуированных/ живых вакцин

Повышение вирулентности невозможно, поскольку это инактивированная вакцина.

iii) Охрана окружающей среды

В ходе полевых испытаний вакцины на безопасность и эффективность следует отслеживать и регистрировать ее взаимодействие с другими вакцинами (например, вакциной против миксоматоза) или фармацевтическими продуктами (лечебный корм, содержащий антибиотики против респираторных заболеваний и бактериального энтерита). На данный момент о каких-либо случаях взаимодействия не сообщалось.

Инактивированная вакцина не распространяется в окружающей среде, и в ходе ранее проведенных испытаний не обнаружено проблем экотоксичности, связанных с вирусными антигенами. Риск экотоксичности, связанный с применением вакцины, равен нулю вследствие характера вакцины (инактивированная вакцина для парентерального введения). Вакцина не содержит ингредиентов, которые могут представлять опасность для окружающей среды. Кроме того, введение вакцины осуществляется путем инъекции, поэтому заражение окружающей среды маловероятно. Для соответствия самым высоким

стандартам безопасности с соблюдением надлежащих санитарно-гигиенических норм использованные ампулы погружают в антисептический раствор.

2.3.2. Требования к эффективности

Эффективность вакцины проверяется в лабораторных условиях при помощи контрольного заражения и серологических исследований. Производят контрольное заражение сорока кроликов (20 вакцинированных и 20 невакцинированных) в возрасте не моложе 4 месяцев путем введения им вирулентного вируса: не менее 90% вакцинированных животных должны иметь иммунитет, при условии, что по результатам серологических исследований получены положительные титры, и доля контрольных невакцинированных животных, погибших в течение наблюдательного периода, должна быть аналогична регистрируемой в естественных условиях в соответствии с типом штамма (то есть, 70–90% для RHDV и 5–70% для RHDV2).

Эффективность вакцины в полевых условиях может быть определена путем оценки сероконверсии в образцах крови, взятых у откормочных и племенных животных в различные контрольные моменты после вакцинации. Титры определяют при помощи К-ИФА и изо-ИФА для IgM, IgA и IgG, используя специфические и гомологичные методы в соответствии с типом вируса (RHDV/RHDVa и RHDV2).

Перед первой вакцинацией следует подтвердить при помощи К-ИФА полное отсутствие у всех кроликов антител к RHDV или наличие титров, величина которых соответствует нижнему допустимому пределу иммунного титра $\leq 1/10$. У вакцинированных животных в течение короткого периода времени развивается иммунитет против RHDV: в сыворотке инфицированных кроликов антитела присутствуют уже через 3–4 дня после заражения (IgM и IgA), тогда как у кроликов, вакцинированных инактивированной адьювантной вакциной, первые антитела обычно появляются по прошествии 7–10 дней (только IgM). IgG появляются примерно через 15–20 дней. После вакцинации IgA не образуются или образуются в очень малых количествах. Поскольку образование IgA происходит только после заражения живым вирусом, распространяющимся ороназальным путем, IgA могут рассматриваться в качестве маркера контакта с полевым вирусом. Иммунная система слизистых оболочек также может участвовать в формировании защиты от заболевания, даже в случае парентерального, а не орального введения вакцины. К таким выводам привели результаты экспериментов, предусматривавших контрольное заражение вакцинированных кроликов, осуществлявшееся оральным путем. При этом в сыворотке очень быстро обнаруживались IgA, но не IgM. Это позволяет предположить, что В-клетки памяти, способные продуцировать IgA, присутствуют уже на уровне слизистых, которые являются, как правило, первым участком, где происходит размножение RHDV.

Существует очевидная корреляция между титром, определенным посредством К-ИФА, и состоянием иммунитета к заболеванию, вызываемому гомологичным штаммом, то есть, кролики, для которых титры антител, специфичных к одному штамму (RHDV/RHDVa/RHDV2), превышают 1/10, не демонстрировали никаких признаков болезни после контрольного заражения тем же вирулентным штаммом. У кроликов, перенесших заболевание, титры, определенные серологическими методами, могут достигать до 1/20480, тогда как у вакцинированных кроликов они обычно находятся в интервале от 1/40 до 1/640, в зависимости от времени, прошедшего с момента вакцинации. Материнские антитела (только IgG) у молодых кроликов, рожденных от здоровых вакцинированных самок, обычно исчезают в течение первых 30 дней жизни, но сохраняются дольше (до возраста 45–55 дней), если кролик рожден переболевшей самкой, поскольку пассивные титры молодых кроликов напрямую связаны с титрами их матерей. Это справедливо для молодых кроликов из промышленных хозяйств, которых довольно рано (в возрасте 25–35 дней) отлучают от матери, тогда как у молодых диких кроликов материнские антитела могут сохраняться в течение 80 дней (Forrester *et al.*, 2002). У молодых кроликов (моложе 35–40 дней) низкий уровень антител (1/80–1/320) может быть обусловлен также активным инфицированием RHDV/RHDVa, не приведшим к возникновению заболевания, что часто случается у животных в этом возрасте.

Данные, изложенные в литературе, указывают на длительный характер иммунитета, создаваемого одной вакцинацией (до 15 месяцев). Через 9–12 месяцев после вакцинации титры в 2–4 раза ниже, чем наблюдаемые через 2–3 недели после вакцинации. Ревакцинационный эффект, как в случае естественного инфицирования, так и в случае ревакцинации, зависит от времени, прошедшего со времени вакцинации, то есть, он ниже через 5–7 месяцев после вакцинации и выше у животных, вакцинированных до указанного момента.

Для точного определения продолжительности и эффективности иммунной защиты рекомендуется провести следующий тест: 20 кроликов, вакцинированных один раз, делят на группы и в течение года подвергают серологическому исследованию с интервалом в 1 месяц. Каждой группе инокулируют вирулентный RHDV через 3, 6, 9 или 12 месяцев после вакцинации. Контрольное заражение должно вызывать увеличивающуюся сероконверсию, которая напрямую связана с временем, прошедшим с момента вакцинации. Отсутствие клинических признаков заболевания и смертности подтверждает высокую эффективность вакцины.

2.3.3. Стабильность

Должны быть представлены доказательства того, что вакцина успешно проходит тест на специфическую активность партии через 3 месяца после окончания установленного срока хранения.

Как правило, для вакцин в многодозовых контейнерах требуется подходящий консервант. Необходимо убедиться в том, что действие консерванта сохраняется без изменений в течение всего срока хранения.

3. Вакцины на основе биотехнологий

Проведено несколько исследований по экспрессии капсидного белка RHDV в клетках *Escherichia coli*, а также по получению вируса осповакцины и аттенуированного вируса миксомы, экспрессирующих капсидный белок RHDV. Более того, различные авторы указывают на то, что рекомбинантный капсидный белок VP60, экспрессируемый системой «бакуловир/клетки линии Sf9», способен к самосборке в вирусоподобных частицах (ВПЧ), которые структурно и антигенно идентичны вирионам ГБК. В то время как гибридный белок, экспрессируемый в клетках *E. coli*, практически нерастворим и обладает низкой иммуногенностью, активная иммунизация может быть достигнута с помощью ВПЧ, получаемых в бакуловиральной системе, или путем использования рекомбинантных вирусов осповакцины, миксомы и канарипокса, вводимых внутримышечно или орально. В частности, кролики, вакцинированные рекомбинантным вирусом миксомы, экспрессирующим капсидный белок RHDV, демонстрировали устойчивость к заболеванию при контрольном заражении летальными дозами RHDV и вируса миксомы. Данный тип рекомбинантной вакцины, то есть, модифицированный вирус миксомы, экспрессирующий основной белок вируса ГБК, разработан, прошел регистрацию и имеется в продаже в нескольких странах в виде препарата для парентерального введения.

Структурный белок VP60 был экспрессирован также в клетках трансгенных растений: в одном случае с помощью нового вектора на основе вируса сливовой оспы (PPV-NK), в другом случае в клетках трансгенного томата под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. В обоих случаях иммунизация кроликов экстрактами растений *Nicotiana clevelandii*, зараженными химерой PPV-NK VP60, и экстрактами листьев томата, несущими упомянутый модифицированный 35S промотор, приводила к возникновению эффективного иммунного ответа, обеспечившего защиту животных при контрольном заражении летальной дозой RHDV. Однако на данный момент ни одна из этих вакцин не прошла регистрацию и, следовательно, не поступила в продажу.

Во Франции разработана вакцина для внутрикожного введения, представляющая собой комбинацию получаемой из материала печени традиционной инактивированной вакцины против вируса ГБК и живой аттенуированной вакцины против вируса миксомы. Вакцина предлагается на рынках некоторых европейских стран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BARBIERI I., LAVAZZA A., BROCCHI E., KONIG M. & CAPUCCI L. (1997). Morphological, structural and antigenic modifications of rabbit haemorrhagic disease virus in the course of the disease. Proceedings of the 1st Symposium on Calicivirus of the European Society of Veterinary Virology (ESVV), Reading, UK, 15–17 September 1996, 182–193.
- CAMARDA A., PUGLIESE N., CAVADINI P., CIRCELLA E., CAPUCCI L., CAROLI A., LEGRETTO M., MALLIA E. & LAVAZZA A. (2014). Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Res. Vet. Sci.*, **97**, 642–645. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.10.008.
- CAPUCCI L., FALLACARA F., GRAZIOLI S., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & BROCCHI E. (1998). A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.*, **58**, 115–126.
- CAPUCCI L., FRIGOLI G., RONSHOLT L., LAVAZZA A., BROCCHI E. & ROSSI C. (1995). Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res.*, **37**, 221–238.
- CAPUCCI L., FUSI P., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & ROSSI C. (1996). Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J. Virol.*, **70**, 8614–8623.
- CAPUCCI L., NARDIN A. & LAVAZZA A. (1997). Seroconversion in an industrial unit of rabbits infected with a non-pathogenic rabbit haemorrhagic disease-like virus. *Vet. Rec.*, **140**, 647–650.
- CAPUCCI L., SCICLUNA M.T. & LAVAZZA A. (1991). Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and European brown hare syndrome. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **10**, 347–370.
- COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., BOYD V. & WESTBURY H.A. (1995). A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.*, **43**, 85–96.
- COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGUAS C., MORRISY C.J. & WESTBURY H.A. (1996) Presence of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in rabbit tissues as revealed by a monoclonal antibody dependent capture ELISA. *J. Virol. Methods*, **58**, 145–154.
- COOKE B.D., ROBINSON A.J., MERCHANT J.C., NARDIN A. & CAPUCCI L. (2000). Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia. *Epidemiol. Infect.*, **124**, 563–576.

- DALTON K.P., NICIEZA I., BALSEIRO A., MUGUERZA M.A., ROSELL J.M., CASAIS R., ÁLVAREZ Á.L. & PARRA F. (2012). Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 2009–2012. doi: 10.3201/EID1812.120341.
- DUARTE M.D., CARVALHO C.L., BARROS S.C., HENRIQUES A.M., RAMOS F., FAGULHA T., LUÍS T., DUARTE E.L. & FEVEIREIRO M. (2015). A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J. Virol. Methods*, **219**, 90–95.
- FORRESTER N.L., TROUT R.C. & GOULD E.A. (2002). Benign circulation of rabbit haemorrhagic disease virus on Lambay Island, Eire. *Virology*, **358**, 18–22.
- GALL A., HOFFMANN B., TEIFKE J.P., LANGE B. & SCHIRRMEIER H. (2007). Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, **120**, 17–32.
- GOULD A.R., KATTENBELT J.A., LENGHAUS C., MORRISSY C., CHAMBERLAIN T., COLLINS B.J. & WESTBURY H.A. (1997). The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.*, **47**, 7–17.
- GRANZOW H., WEILAND F., STREBELOW H.-G., LU C.M. & SCHIRRMEIER H. (1996). Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res.*, **41**, 163–172.
- GUITTRE C., BAGINSKI I., LE GALL G., PRAVE M., TREPO O. & COVA L. (1995). Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 128–132.
- LAVAZZA A., SCICLUNA M.T. & CAPUCCI L. (1996). Susceptibility of hares and rabbits to the European Brown Hare Syndrome Virus (EBHSV) and Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) under experimental conditions. *J. Vet. Med. [B]*, **43**, 401–410.
- LE GALL-RECULE G., LAVAZZA A., MARCHANDEAU S., BERTAGNOLI S., ZWINGELSTEIN F., CAVADINI P., MARTINELLI N., LOMBARDI G., GUERIN J.L., LEMAITRE E., DECORS A., BOUCHER S., LE NORMAND B. & CAPUCCI L. (2013). Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vet. Res.*, **44**, 81. DOI: 10.1186/1297-9716-44-81.
- LE GALL-RECULE G., ZWINGELSTEIN F., PORTEJOIE Y. & LE GALL G. (2001). Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of rabbit haemorrhagic disease and european brown hare syndrome viruses. *J. Virol. Methods*, **97**, 49–57.
- LIU S.J., XUE H.P., PU B.Q. & QUIAN N.H. (1984). A new viral disease in rabbits. *Anim. Hus. Vet. Med.*, **16**, 253–255.
- MARCHANDEAU S., LE GALL-RECULE G., BERTAGNOLI S., AUBINEAU J., BOTTI G. & LAVAZZA A. (2005). Serological evidence for a non-protective RHDV-like virus. *Vet. Res.*, **36**, 53–62.
- NAGESHA H.S., MCCOLL K.A., COLLINS B.J., MORRISSY C.J., WANG L.F. & WESTBURY (2000). The presence of cross-reactive antibodies to RHDV in Australian wild rabbits prior to the escape of the virus from quarantine. *Arch. Virol.*, **145**, 749–757.
- OHLINGER R.F., HAAS B., MEYERS G., WEILAND F. & THIEL H.J (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J. Virol.*, **64**, 3331–3336.
- PUGGIONI G., CAVADINI P., MAESTRALE C., SCIVOLI R., BOTTI G., LIGIOS C., LE GALL-RECULE G., LAVAZZA A. & CAPUCCI L. (2013). The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.*, **44**, 96. doi: 10.1186/1297-9716-44-96.
- ROBINSON A.J., KIRKLAND P.D., FORRESTER R.I., CAPUCCI L. & COOKE B.D. (2002). Serological evidence for the presence of a calicivirus in Australian wild rabbits, *Oryctolagus cuniculis*, before the introduction of RHDV: its potential influence on the specificity of a competitive ELISA for RHDV. *Wildl. Res.*, **29**, 655–662.
- SCHIRRMEIER H., REIMANN I., KOLLNER B. & GRANZOW H. (1999). Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.*, **144**, 719–735.

STOERCKLE-BERGER N., KELLER-BERGER B., ACKERMANN M. & EHRENSPERGER F. (1992). Immunohistological diagnosis of rabbit haemorrhagic disease (RHD). *J. Vet. Med. [B]*, **39**, 237–245.

STRIVE T., WRIGHT J.D. & ROBINSON A.J. (2009). Identification and partial characterisation of a new Lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology*, **384**, 97–105.

WHITE P.J., TROUT R.C., MOSS S.R., DESAI A., ARMESTO M., FORRESTER N.L., GOULD E.A. & HUDSON P.J. (2004). Epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus in the United Kingdom: evidence for seasonal transmission by both virulent and avirulent modes of infection. *Epidemiol. Infect.*, **132**, 555–567.

WIRBLICH C., MEYERS G., OHLINGER V.F., CAPUCCI L., ESKENS U., HAAS B. & H.-J. THIEL (1994). European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J. Virol.*, **68**, 5164–5173.

*

* *

Примечание: Действует референтная лаборатория МЭБ по геморрагической болезни кроликов (см. Таблицу в части 4 настоящего *Ветеринарно-санитарного кодекса МЭБ по наземным животным* или веб-сайт МЭБ, где размещена обновленная версия списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации в отношении методов диагностики, реагентов и вакцин против геморрагической болезни кроликов обращайтесь в справочную лабораторию МЭБ.