Проект

Изображение государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

# Животные

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ

# Основные положения

**СТ РК**

*Настоящий проект стандарта*

*не подлежит применению до его утверждения*

**Комитет технического регулирования и метрологии**

**Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан**

**(Госстандарт)**

**Астана**

**Предисловие**

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан
2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от «\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ года № \_\_\_\_.

**3** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан   
«О ветеринарии» от 10 июля 2002 года № 339.

**4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 20\_\_ г.**

**ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет**

**5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Документы по стандартизации», а текст изменений – в ежемесячных информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном каталоге «Национальные стандарты».*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Введение**

Геморрагическая болезнь кроликов (ГБК) - это очень заразный и смертельный гепатит лепоридий. ГБК вызывается калицивирусом (род Lagovirus, семейство Caliciviridae), небольшим круглым РНК-вирусом без оболочки, содержащим только один основной капсидный белок (VP60) (Ohlinger et al., 1990). Род Lagovirus также включает вирус синдрома европейского бурого зайца (ВСЕЗР), возбудитель болезни зайца-русака (Lepus europaeus), называемой СЕЗР. Несмотря на их высокое генетическое родство (сходство нуклеотидов VP60 составляет 70%), ВГБК и ВСЕЗР являются двумя различными видами вирусов (Capucci et al., 1991; Green et al., 2000; Wirblich et al., 1994).

Недавно была предложена новая классификация рода Lagovirus, основанная на кодирующих последовательностях VP60 (Le Pendu et al., 2017). В предложении, еще не одобренном Международным комитетом по таксономии вирусов (МКТВ), все лаговирусы сгруппированы в уникальный вид вируса (Lagovirus europaeus). Данный вирус можно было бы разделить на две геногруппы (GI и GII), которые можно подразделить на шесть генотипов (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GII.1 и GII.2) и далее на варианты (четыре для GI.1 и три для GII.1). Согласно новой классификации геномов, геномы «классического ВГБК», включая предыдущие геногруппы G1-G5, впервые были описаны в Китае (Китайская Народная Республика) в 1984 году (Liu et al., 1984), а подтип ВГБКa, ранее соответствующий геногруппе G6, установлен в Европе в 1996 году (Capucci et al., 1998), в настоящее время классифицируются как GI.1 (a-d). Новый вирус, связанный с ВГБК, называемый ВГБК2 (или ВГБКb), который появился во Франции в 2010 году (Le Gall-Recule et al., 2013), в настоящее время классифицируется как GI.2. Геном ВСЕЗР классифицируется как GII.1. Однако, поскольку официальная таксономия МКТВ для семейства Caliciviridae по-прежнему соответствует описанию Green et al. (2000), в настоящем стандарте используется нынешняя классификация лаговирусов.

Европейский кролик (Oryctolagus cuniculus) является единственным восприимчивым видом хозяев для ВГБК, а другие виды лагоморфов, включая американских кроликов (Sylvilagus spp.), чернохвостых зайцев (Lepus californicus) и безхвостовых кроликов (Romerolagus diazzi), невосприимчивы. Круг хозяев ВГБК2 шире, поскольку он также может вызывать заболевание у сардинского капского зайца (L. capensis var mediterraneus), корсиканского зайца (L. corsicanus), зайца-русака (L. europaeus), зайца-беляка (L. timidus) и различных видов зайцев (Lepus) и американских кроликов (Sylvilagus) в Северной Америке, даже если они обладают разной степенью восприимчивости.

ВСЕЗР обычно вызывает заболевание у Lepus europaeus, L. timidus и L. corsicanus, а иногда и у флоридских кроликов (Sylvilagus floridanus), но не у L. granatensis, L. castroviejoi и L. capensis.

О заражении ВГБК у людей и других млекопитающих никогда не сообщалось. Прививка положительной тканевой суспензии ВГБК 28 различным видам позвоночных, кроме кроликов, не привела к возникновению заболевания, и с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) репликация вируса обнаружена не была. Напротив, типичные поражения и смерть наблюдались при заражении лабораторных кроликов положительными на ВГБК2 экстрактами двух мелких грызунов, средиземноморской полевки (Microtus duodecimcostatus) и белозубки (Crocidura russula), у которых был обнаружен положительный результат на ВГБК2 с помощью ОТ-ПЦР.

Появление ВГБК2 радикально изменило глобальную эпидемиологическую ситуацию по ГБК, главным образом потому, что это серотип, отличный от ВГБК, и он может вызывать заболевание у молодых кроликов и зайцев. В настоящее время ВГБК2 ассоциируется почти со всеми случаями ГБК, выявленными в Европе, и лишь несколько случаев, вызванных ВГБКa, произошли в Италии. С 2010 года ВГБК2 быстро распространился в Северной Африке и Северной Европе и был зарегистрирован в Западной Африке. Он также стал эндемичным в Австралии, где вытесняет ВГБК. Совсем недавно сообщалось об единичных вспышках ГБК, вызванных ВГБК2, у европейских диких кроликов и диких видов Lepus и Sylvilagus в Северной Америке.

ГБК характеризуется высокой заболеваемостью, но с переменным уровнем смертности в зависимости от типа вируса и возраста кролика. При заражении ВГБК/ВГБКа смертность составляет около 80-90 %, и у 5-10 % кроликов наблюдается подострое или хроническое клиническое течение. Хотя кролики всех возрастов могут быть инфицированы, инфекция протекает субклинически у животных младше 6-8 недель. Заболевание, вызываемое ВГБК2, может длиться несколько дольше, а уровень смертности сильно варьирует (50-80 %) в зависимости от штамма; самые недавно обнаруженные штаммы (с 2014 по 2015 год) оказались постепенно более вирулентными, чем те, которые были первоначально определены в 2010-2011 годах (Capucci et al., 2017). Смерть может наступить даже у не отлученных кроликов в возрасте от 7 до 15 дней и старше.

Инкубационный период ГБК колеблется от 1 до 6 дней. В острых случаях у инфицированных животных развивается высокая температура (больше 40 °C), и они внезапно умирают в течение 12-36 часов после ее начала. Единственными клиническими признаками могут быть предсмертные вопли, за которыми быстро следует обессиливание и смерть. Субклиническая хроническая ГБК характеризуется генерализованной желтухой, потерей веса и летаргией. Смерть может наступить в течение 1-2 недель, но некоторые кролики выживают после сероконверсии. Специфическая и соответствующая IgM-реакция появляется в течение 3 дней, за которой немедленно следует IgA- и IgG-реакций 2-3 дня спустя. Вирусная РНК обнаруживается с помощью ПЦР в крови и фекалиях кроликов реконвалесцента в течение 15 недель после заражения, а также у кроликов, инфицированных ВГБК, но уже защищенных ранее приобретенными специфическими антителами (т.е. вакцинированных или переживших инфекцию) (Gall et al., 2007). Является ли это следствием медленного выведения вируса или свидетельствует о реальной и длительной репликации вируса (персистенции), еще предстоит установить.

После серологического тестирования на ВГБК несколько непатогенных лаговирусов, связанных с ВГБК (калицивирус кролика - КВК), были выделены и частично охарактеризованы в Европе (Capucci et al., 1996; Le Gall-Recule et al., 2015; Marchandeau et al., 2005) и Океании (Strive et al., 2009). Непатогенные лаговирусы индуцируют серологическую реакцию, которая может препятствовать серологической диагностике ГБК и усложнять ее (Capucci et al., 1991; Cooke et al., 2000; Robinson et al., 2002). Недавно непатогенные лаговирусы были обнаружены у кроликов в Европе и Австралии (Cavadini et al., 2016; Droillard et al., 2018; Mahar et al., 2019).

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ**

**Основные положения**

**Дата введения**

# Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы лабораторной диагностики вирусной геморрагической болезни кроликов (далее - ГБК).

**2 Методы диагностики**

**Таблица 1 – Методы испытаний, доступные для диагностики ГБК и их цель**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Метод** | **Цель** | | | | | |
| Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения | Содействие политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Превалентность инфекции– надзор | Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации |
| **Обнаружение возбудителя1** | | | | | | |
| **ИФА** | + | - |  | +++ | + | - |
| **ЭМ** | - | - | - | ++ | - | - |
| **ГА** | - | - | - | + | - | - |
| **ОТ-ПЦР в реальном времени** | + | - | ++ | +++ | + | - |
| **Обнаружение иммунной реакции** | | | | | | |
| **кИФА** | +++ | +++ | +++ | - | +++ | +++ |
| **изоИФА** | ++ | +++ | ++ |  | ++ | ++ |
| **ИГ** | ++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ |
| +++ = рекомендуется для этой цели;  ++ = рекомендуется, но имеет ограничения;  + = подходит в очень ограниченных случаях;  - = не подходит для этой цели.  ИФА = иммуноферментный анализ;  ЭM = электронная микроскопия;  ГA = тест на гемагглютинацию;  ОТ-ПЦР= полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;  кИФА = конкурентный ИФА;  изоИФА = ИФА на изотип;  ИГ = ингибирование гемагглютинации. | | | | | | |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1 Рекомендуется использовать комбинацию методов обнаружения возбудителя, применяемых к одному и тому же клиническому образцу

**Проект, редакция 1**

**2.1 Обнаружение возбудителя**

Печень кроликов, пораженных ГБК, содержит самый высокий титр вируса (от 103 LD50 [50 % смертельной дозы] до 106,5 LD50/мл 10 % гомогената и от 107 до 1010 копий генома на мг ткани) и является органом выбора для вирусной идентификации как для ВГБК, так и для ВСЕЗР. Количество вируса, присутствующего в других частях тела, прямо пропорционально васкуляризации; таким образом, подходит селезенка, в то время как сыворотка может служить альтернативным диагностическим материалом.

В случае подострой или хронической формы ГБК реакция антител запускает выведение вируса из печени и селезенки кроликов, так что вместо ВГБК обнаруживаются вирусоподобные частицы ГБК (ВПЧ), главным образом в селезенке, но также и в печени (Capucci et al., 1991). Этот ВПЧ характеризуется отсутствием внешней оболочки на вирусном капсиде, образованном половиной С-терминального отдела VP60, и ВПЧ отрицательный в тесте на гемагглютинацию (ГA), а также с моноклональными антителами против ВГБК (MAТ), направленными на внешние конформационные эпитопы (Capucci et al., 1995).

Первоначальная обработка диагностических образцов практически идентична независимо от применяемого метода диагностики, за исключением методов иммуноокрашивания. Фрагмент органа механически гомогенизируют в 5-20 %-ном (по массе) фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), рН 7,2-7,4, и осветляют центрифугированием при 5000 g в течение 10-15 минут. На данном этапе супернатант может быть непосредственно исследован с помощью теста на ГA или иммуноферментного анализа (ИФА). Если образец должен быть исследован с помощью электронной микроскопии (ЭМ), рекомендуется провести повторное центрифугирование при 12 000 g в течение 15 минут перед окончательным ультрацентрифугированием. Для обнаружения методом ПЦР вирусная РНК из образцов также может быть непосредственно извлечена из тканей. Учитывая высокую вирусную нагрузку ВГБК-положительных образцов и высокая аналитическая чувствительность методов ПЦР, на преданалитическом этапе подготовки образцов необходимо соблюдать тщательные меры предосторожности, чтобы избежать проблем перекрестного загрязнения между образцами.

**2.2 Иммунноферментный анализ**

Обнаружение вирусов с помощью ИФА основано на методе «сэндвич», и было описано несколько его вариаций. 10 % гомогенатов печени кроликов, пораженных ГБК, дали положительный результат в разведениях от 1/100 до 1/10000 с этими препаратами. Таким образом, несмотря на ограниченную чувствительность ИФА по сравнению с методами ПЦР, ИФА является лучшим методом диагностики острой ГБК. В одной процедуре используются реагенты, растворы, а также соблюдаются условия (время и температура), приведенные в конкурентной ИФА (кИФА) для серологии (см. 2.11). Используемый микропланшет должен обладать высокой адсорбционной способностью. Гомогенат печени представляет собой 10 %-ную (м/об) суспензию в стандартном ФСБ;   
50 мкл/лунка - стандартный объем для использования на каждом этапе. В качестве буфера для всех стадий используется ФСБ с 1 % дрожжевого экстракта (или бычьего сывороточного альбумина [БСА]) и 0,1 % полисорбата 20, рН 7,4. Все стадии инкубации проводятся в течение 50-60 минут при температуре 37 °C при легком перемешивании. После всех этапов необходимо выполнить три промывки продолжительностью 3-5 минут с использованием ФСБ с 0,05 %-ным содержанием полисорбата 20. В качестве контроля необходимо использовать положительный и отрицательный гомогенат печени кролика с ГБК. Конъюгат пероксидазы хрена (КПОХ) может быть очищен lgG от специфической поликлональной сыворотки или МАТ (см. 2.11). Анти-ВГБК МАТ были получены в нескольких лабораториях и могут использоваться вместо поликлональных сывороток для кроликов. Также были получены MAТ, распознающие специфические эпитопы, экспрессируемые только вариантом ВГБКa, а также вариантом ВГБК2 (Le Gall-Recule et al., 2013).

Чтобы определить ВГБК и относительные варианты, присутствующие в образцах (ВГБК, ВГБКa или ВГБК2) методом «сэндвич» твёрдофазного иммуноферментного анализа, рекомендуется провести тест каждого образца повторно не менее четырех раз, а затем использовать конъюгаты КПОХ с различной специфичностью, т.е. MAТ, распознающие антигенные детерминанты, присутствующие на поверхности вируса и экспрессируемые альтернативно с помощью классического штамма, с помощью ВГБКa или ВГБК2, и пул МАТ, распознающих внутренние эпитопы, которые могут обнаруживать гладкие, деградированные ВПЧ, а также ВСЕЗР. Аналогичные методы захвата антигена были описаны для обнаружения либо ВГБК (Collins et al., 1996), либо ВГБК2 (Dalton et al., 2018).

2.2.1. Порядок проведения теста (пример)

Шаги, которые отдельно не указаны, приведены в процедуре к-ИФA для серологии (см. 2.11).

i) На пластину наносят гипериммунную сыворотку против ВГБК, гипериммунную сыворотку против ВГБК2 и отрицательную сыворотку против ВГБК. Последняя служит контролем неспецифических реакций (ложноположительных проб). Для каждого образца сенсибилизируют восемь лунок положительной сывороткой и четыре лунки отрицательной.

ii) Экстракт печени разводят до 1/5 и 1/30 в буфере ИФA (см. выше) непосредственно в лунках планшета (например, добавляют 45 мкл буфера во все лунки планшета, добавляют 10 мкл образца в первые две лунки, а затем, после встряхивания, переносят 9 мкл во вторые лунки). Контрольные образцы, как положительные, так и отрицательные, обрабатывают таким же образом, как и образцы.

iii) После инкубации и промывки (см. выше) инкубируют со специфическими конъюгатами КПОХ.

iv) После последней серии промывок добавляют хромогенный субстрат. Орто фенилендиамин (ОФД) может быть использован в качестве субстрата пероксидазы для окончательного развития реакции. Используют 0,15 М цитратфосфатный буфер, рН 5,0, с 0,5 мг/мл ОФД и 0,02 % H2O2. Реакцию останавливают через 5 минут добавлением 50 мкл   
1 м H2SO4.

v) Поглощение измеряют при длине волны 492 нм. Положительными образцами являются те, которые показывают разницу в поглощении больше 0,3 между лунками, покрытыми сывороткой, содержащей ВГБК, и лунками, покрытыми отрицательной сывороткой. Обычно при разведении 1/30 положительные образцы, взятые у кроликов с классической острой формой ГБК, дают значение поглощения больше 0,8, в то время как значение поглощения отрицательного образца при разведении 1/5 колеблется от 0,1 до 0,25.

Для диагностики ВСЕЗР используют метод «сэндвич»-ИФА, специфичную для ВСЕЗР, но из-за высокой антигенной разницы, существующей между этими агентами, присутствует риск получения ложноотрицательных результатов. Настоятельно рекомендуется использовать метод «сэндвич»-ИФА, специфичную для ВСЕЗР, с использованием либо кроличьей сыворотки с высоким титром положительного анти-ВСЕЗР, либо перекрестно реагирующих MAТ ВГБК (Capucci et al., 1991; 1995), либо специфичных MAТ ВСЕЗР вместо кроличьей сыворотки (Capucci et al., 1991).

**2.3 Методы распознавания нуклеиновых кислот**

Благодаря низкому уровню вариабельности последовательностей среди изолятов ВГБК и высокой чувствительности ПЦР, обратная транскрипция (ОП)-ПЦР представляет собой идеальный экспресс-диагностический тест на ГБК, как описано несколькими авторами (Gould et al., 1997; Guittre et al., 1995; Yang et al., 2008). Этот метод проводят на образцах органов (оптимально печени или селезенки), мочи, кале и сыворотках крови с использованием различных олигонуклеотидных праймеров, полученных из капсидной области генома ВГБК. Референтная лаборатория МЭБ по ГБК использует одностадийную ОТ-ПЦР со следующими праймерами, специфичными для гена VP60: прямой: 5'-CCT-GTT-ACC-ATC-ACC-ATG-CC-3'; обратный: 5'-CAA-GTT-CCA-RTG-SCT-GTT-GCA-3'; праймеры способны амплифицировать все варианты ВГБК, включая ВГБК2. Только для амплификации ВГБК2 следует использовать специфические праймеры, т.е. «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 длиной 794 п.о., расположенную в С-концевой части гена, кодирующего VP60 из ВГБК2 (Le Gall-Recule et al., 2013) или «Fra109-F» (5'-ACT-ACT-AGC-GTG-GTC-ACC-ACC-3') и «Fra567-R» (5'-TTG-TTA-TAA-ACG-CTC-AGG-ACC-AAC-3'), которые амплифицируют последовательность длиной   
481 п.о., расположенную в первой части гена VP60 (Velarde et al., 2017). Вирусная РНК может быть непосредственно амплифицирована с помощью одноэтапной стандартной ОТ-ПЦР или сначала ретротранскрибирована в кДНК, а затем амплифицирована с помощью ПЦР. Для визуализации продукта ПЦР амплифицированную ДНК подвергают электрофорезу в агарозном геле. При необходимости специфичность продукта ПЦР может быть определена путем секвенирования.

Аналогичный метод ОТ-ПЦР был использован для идентификации непатогенного КВК (Capucci et al., 1998) или HaCV (Cavadini et al., 2016; Droillard et al., 2018; Mahar et al., 2019) с использованием универсальных праймеров для лаговирусов (Strive et al., 2009). ОТ-ПЦР представляет собой чрезвычайно чувствительный метод обнаружения ВГБК и по меньшей мере в 104 раза более чувствителен, чем ИФА (Guitt et al., 1995). ОТ-ПЦР не является строго необходимым для рутинной диагностики, но является более чувствительным, удобным и быстрым, чем другие тесты. Аналогичным образом, ОТ-ПЦР для выявления ВСЕЗР с использованием различных пар праймеров была применена для выявления и характеристики штаммов ВСЕЗР (Le Gall-Recule et al., 2001; Velarde et al., 2017).

В качестве дополнительного диагностического инструмента для выявления ВГБК была разработана мультиплексная ОТ-ПЦР с внутренним контролем в режиме реального времени с использованием флуорогенных зондов и внешних стандартов для определения абсолютного количества РНК (Gall et al., 2007). Олигонуклеотидами, используемыми в данном методе, являются: [VP60-7\_forward: 5'-ACY-TCA-CTG-AAC-TYA-TTG-ACG-3', vp60-8\_reverse: 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 были разработаны ОТ-ПЦР в реальном времени, специфичные для обнаружения ВГБК2. В том, который описан Duarte et al., 2015, используемые олигонуклеотиды являются: [ВГБК2-F: 5'-TGG-AAC-TTG-GCT-TGA-GTG-TTG-A-3', ВГБК2-R: 5'-ACA-AGC-GTG-CTT-GTG-GAC-GG-3'] и зонд [ВГБК2: 5'-FAM-TGT-CAG-AAC-TTG-TTG-ACA-TCC-GCC-C-TAMRA-3'. Использовались и другие протоколы ОТ-ПЦР в реальном времени (см. Библиография).

**2.4 Электронная микроскопия (ЭM)**

ЭМ предпочтительно проводить после ультрацентрифугирования (не менее 100 000 g в течение 30 минут) образца (суспензии органа, приготовленной, как описано в 2.1) для концентрирования вирусных частиц. Полученный осадок повторно суспендируют в ФСБ или дистиллированной воде, помещают на решетку на несколько минут, а затем отрицательно окрашивают 2 %-ным фосфовольфраматом натрия (NaPT), рН 6,8, в течение 1,5 минут. Вирионы ГБК видны в виде непокрытых частиц диаметром 32-35 нм, представляющих собой внутреннюю оболочку (диаметром 25-27 нм), очерченную ободком, от которого отходят десять коротких, равномерно распределенных периферических выступов. Гладкие частицы (s-ВГБК) идентифицируются по полной потере внешних частей, становясь идеально шестиугольными и меньшего размера, при этом виден только ободок капсида (Capucci et al., 1991).

Иммуно-ЭМ (ИЭМ), в которой используются те же серологические принципы, что и в методе ЭМ эффективен для диагностики и характеристики различных вирусов, включая ВГБК. ИЭМ, которая хорошо работает с антисыворотками или MAТ, может быть более специфичной, чем традиционное отрицательное окрашивание ЭМ, благодаря сочетанию морфологической идентификации и антигенной специфичности (Lavazza et al., 2015).

ВСЕЗР также может быть идентифицирован в диагностических образцах с помощью электромагнитного исследования. Кроме того, для выявления ВСЕЗР может быть использован метод ИЭМ с применением реконвалесцентной сыворотки анти-ВСЕЗР или специфических МАТ анти-СЕЗР. Используя антисыворотку, специфичную для ВСЕЗР и ВГБК, можно провести различие между этими двумя вирусами.

**2.5 Тест на гемагглютинацию**

ГA была первым тестом, который был использован для стандартной лабораторной диагностики ГБК (Liu et al., 1984). Поскольку ВГБК2 проявлял активность ГA, аналогичную активности ВГБК/ВГБКа (Le Gall-Recule et al., 2013), данный метод может быть использован также для диагностики ВГБК2. Тест на ГA следует проводить с человеческими эритроцитами (RBC) группы O, свежесобранными, хранящимися в течение ночи в растворе Альсевера и промытыми в 0,85 % ФСБ при рН 6,5 (диапазон 67,2). ГА менее выражена или вообще отсутствует при использовании эритроцитов других видов. Промытые эритроциты суспендируют при содержании 0,75 % в ФСБ. Двукратный титр осветленной супернатантной жидкости 10 % гомогената ткани печени или селезенки инкубируют с равным объемом промытых эритроцитов в герметичном микротитрационном планшете с круглым дном предпочтительно при температуре 4 °C. После 1 часа инкубации (диапазон от 20 минут до 2 часов) агглютинация при разведении до конечной точки >1/160 считается положительной. Более низкие титры следует рассматривать как сомнительные, и проверяют другими методами. Около 10 % образцов, признанных положительными с помощью ИФА или ЭМ, дают отрицательные результаты в ГA (ложноотрицательный результат ГA). Некоторые изоляты ГБК могут демонстрировать зависящие от температуры различия в характеристиках гемагглютинации и могут проявлять активность ГA только при проведении теста при температуре 4 °C. Ложноотрицательность ГA в основном обнаруживается в органах кроликов с подострой/хронической формой заболевания, и это зависит от характеристик ВПЧ.

Органы кроликов редко дают значительный титр при использовании протокола ГA ВГБК. Для демонстрации активности ГА в органах кроликов, инфицированных ВСЕЗР, следует использовать модифицированную процедуру: все этапы проводят при температуре 4 °C, суспензию органов обрабатывают равным объемом хлороформа, а эритроциты используют при рН не выше 6,5 (Capucci et al., 1991). При использовании данного метода только около 50 % образцов дают положительные результаты. Это связано с тем, что заболевание кроликов часто протекает подостро или хронически, и поэтому вирус обладает антигенными и структурными характеристиками, типичными для ВПЧ (Capucci et al.,1991).

Из-за практической трудности получения и хранения человеческих эритроцитов и риска, связанного с работой с этими клетками, а также из-за трудности получения согласованных результатов данный тест следует заменить другими вирусологическими методами, такими как определение антигена ИФА или ПЦР.

**2.6 Иммуноокрашивание**

Ткани, зафиксированные в 10 % забуференном формалине и залитые в парафин, могут быть иммуноокрашены стандартными методами с использованием специфических МАТ (Neimanis et al., 2018).

Интенсивное окрашивание ядер и диффузное окрашивание цитоплазмы некротизированных гепатоцитов в печени, главным образом в перипортальных областях, являются характерными и специфичными. Также наблюдается положительное окрашивание макрофагов и клеток Купффера, а также гепатоцеллюлярные реакции. Положительные реакции также могут быть обнаружены в макрофагах легких, селезенки и лимфатических узлах, в мезангиальных клетках почек и в костном мозге, которые могут демонстрировать заметное снижение соотношения миелоидных и эритроидных клеток и увеличение доли незрелых миелоидных клеток (Stoerckle-Berger et al., 1992) (снижение соотношения миелоидов к эритроидам) (Neimanis et al., 2018).

Криосрезы тканей, зафиксированные в метаноле или ацетоне, могут быть непосредственно иммуноокрашены путем инкубации в течение 1 часа с конъюгированной с флуоресцеином кроличьей анти-ВГБК сывороткой или MAТ. Специфическая флуоресценция может быть обнаружена в печени, селезенке и почечных клубочках.

**2.7 Вестерн-блоттинг**

Когда другие тесты, например, ГA или ИФA, дают сомнительные результаты (низкая положительность) или есть подозрение, что образцы содержат частицы с-ВГБК, для определения окончательного диагноза используют анализ вестерн-блоттинг, при этом современные методы обнаружения генома (ОТ-ПЦР в реальном времени) особенно эффективны для подтверждения.

Гомогенаты готовят, как описано ранее, а вирусные частицы дополнительно концентрируют (десять раз) путем ультрацентрифугирования (100 000 g в течение   
90 минут) с помощью 20 %-ной (вес.концентрация) сахарозной подушки.

Как супернатант, так и осадок могут быть исследованы для обнаружения, соответственно, субъединиц ВГБК 6S (Capucci et al., 1995) и денатурированного структурного белка ВГБК-VP60 или его протеолитических фрагментов, размер которых может варьироваться от 50 кДа до 28 кДа. В каждом случае используют положительный и отрицательный контрольные образцы.

Белки ВГБК могут быть обнаружены с помощью поликлональных антител или MAТ. Если используют MAТ, они должны распознавать непрерывные эпитопы. Специфичные для ВГБК MAТ, распознающие внутренние или скрытые эпитопы, могут быть также использованы для обнаружения ВСЕЗР. Кроличьи анти-ВГБК гипериммунные сыворотки менее эффективны при распознавании одних и тех же полосовых образований, чем MАТ (Capucci et al., 1995).

Анализ вестерн-блотинга также может быть использован для идентификации ВСЕЗР. Структура белковых полос, обнаруживаемых либо с помощью поликлональной сыворотки против ВСЕЗР, либо с помощью перекрестно реагирующих МАТ анти-ВГБК, аналогична. Однако процент образцов, демонстрирующих вирусную деградацию, выше, и поэтому часто наблюдают несколько фрагментов с более низкой молекулярной массой, происходящих из структурного белка VP60.

**2.8 Инокуляция кроликов**

Поскольку для ВГБК и ВСЕЗР не было создано эффективной системы редупликации in vitro, выделение клеточной культуры не может быть включено в число методов диагностики. Таким образом, инокуляция кроликов остается единственным способом выделения, распространения и титрования инфекционности ВГБК. Однако данного метода следует избегать по этическим соображениям при проведении стандартной диагностики. Если есть основания для проведения данной процедуры, кролики должны быть полностью восприимчивы к вирусу, т.е. им должно быть больше 2 месяцев и у них не должно быть антител к ВГБК (см. серологические методы). ГБК может быть передана с использованием отфильтрованных и обработанных антибиотиками печеночных суспензий, введенных внутримышечно, внутривенно или оро-назально. Когда заболевание клинически очевидно, признаки и посмертные поражения аналогичны тем, которые описаны после естественного заражения. Повышение температуры тела регистрируется между 18 и 24 часами после заражения (p.i.), за которым следует смерть более чем у 80 % привитых животных, в зависимости от типа и вирулентности штамма. Некоторые особи могут оставаться в живых до 6-8 дней после заражения. У животных, перенесших заболевание, наблюдаются лишь кратковременная гипертермия, депрессия и анорексия, но наблюдается поразительная сероконверсия, которую можно легко обнаружить через 3-4 дня после заражения.

**2.9 Серологические тесты**

Инфекция, вызванная ВГБК, может быть диагностирована путем выявления специфической реакции антител. Поскольку гуморальная реакция имеет большое значение для защиты животных от ВГБК, определение титра специфических антител после вакцинации или у выздоравливающих животных позволяет предсказать способность кроликов противостоять инфекции ВГБК. Учитывая антигенные различия, существующие между ВГБК/ВГБКа и ВГБК2, индуцируются различные специфические реакции антител после заражения или гомологичной вакцинации. Серологическая диагностика должна основываться на методах, использующих иммунологические реагенты, специфичные к ВГБК и ВГБК2. Поэтому, особенно при отсутствии или ограниченной анамнестической или эпидемиологической информации, следует провести тесты как на ВГБК, так и на ВГБК2 и сравнить результаты.

Для серологической диагностики ВГБК применяют три основных метода: ингибирование гемагглютинации (ИГ) (Liu et al., 1984), непрямой ИФА (Н-ИФА) и кИФА (Capucci et al., 1991). Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. С точки зрения доступности реагентов и технической сложности проведения теста, то ИГ является наиболее удобным методом, за которым следуют Н-ИФA и кИФA соответственно. С другой стороны, оба метода быстрее и проще, чем ИГ, особенно при тестировании большого количества образцов. Специфичность кИФA заметно выше, чем у двух других методов (Capucci et al., 1991). Описан альтернативный вариант метода кИФA (Collins et al., 1995). Для улучшения серологической интерпретации и правильной классификации иммунологического статуса кроликов также доступна комбинация методов, позволяющих различать реакции антител IgA, IgM и IgG (Cooke et al., 2000).

Могут быть использованы ряд других дополнительных тестов (Cooke et al., 2000) для определенных исследований, а также когда требуется более высокий уровень чувствительности или для выявления антител, индуцированных перекрестно реагирующими непатогенными КВК (см. введение).

К ним относятся:

• Н-ИФА: антиген (ВГБК-положительный гомогенат печени) связывается с твердой фазой с помощью MАТ, эпитоп которого расположен на внешней оболочке ВГБК. Затем сыворотки последовательно разбавляют, начиная с 1/40, и обнаруживают IgG, связанный с антигеном, с помощью реагента, предпочтительно анти-кроличьего IgG МАТ, меченного КПОХ. Данный ИФА обладает более высокой чувствительностью, чем кИФА, что делает возможным измерение антител с высокой перекрестной реактивностью и позволяет обнаруживать антитела с низкой авидностью.

• Твердофазный ИФА (ТФ-ИФА): очищенный антиген непосредственно адсорбируется на твердой фазе, и из-за деформации вируса обнажаются внутренние эпитопы. Таким образом, данный вид ИФА обнаруживает более широкий спектр антител к ВГБК и обладает высокой чувствительностью и низкой специфичностью. По указанным причинам данный вид ИФА также может быть использован для серологии ВСЕЗР. Вместе с Н-ИФA данный тест можно считать специфичным для лаговируса, т.е. способным обнаруживать антитела к распространенным эпитопам лаговируса, присутствующим в половине NH2 от VP60s.

• Сэндвич-ИФА для выявления IgM и IgG в образцах печени или селезенки, уже исследованных с помощью вирусологического теста: такой тест особенно полезен у тех животных, которые умирают от «хронической» формы заболевания, когда обнаружение вируса может быть затруднено с использованием методов ГА или ИФA. В данном случае высокий уровень IgM, специфичного для ВГБК, и низкий уровень IgG, если таковой имеется, являются однозначными маркерами положительности для ГБК.

**2.10 Ингибирование гемагглютинации**

Антиген: Антиген получают с использованием инфицированной печени кролика, взятой сразу после смерти животного. Печень гомогенизируют в 10 %-ном растворе ФСБ, рН 6,4, и осветляют двумя последовательными центрифугированиями на низкой скорости (500 g в течение 20 минут и 6000 g в течение 30 минут). Супернатант, взятый из пробирки таким образом, чтобы избежать образования поверхностного липидного слоя, фильтруют через сетку с размером пор 0,22 мкм, титруют по ГА и разделяют на аликвоты, которые хранят при минус 70 °C.

Образцы сыворотки: Перед проведением теста сыворотки инактивируют путем инкубации при 56 °C в течение 30 минут. Затем сыворотки обрабатывают 25 %-ной (м/об) суспензией каолина (окончательные титры сыворотки: 1/10) при 25 °C в течение 20 минут и центрифугируют. За этим следует вторая обработка каолином, также при температуре   
25 °C в течение 20 минут, на этот раз с использованием 1/10 объема примерно 50 % упакованных человеческих эритроцитов группы О. Их собирают свежими, хранят в течение ночи в растворе Альсевера и промывают в 0,85 %-ном растворе ФСБ, рН 6,5. Сыворотки осветляют центрифугированием.

2.10.1 Порядок проведения теста

i) 50 мкл сыворотки наливают в первую лунку микротитратора с круглым дном и производят двойное разведение в лунки 2-8, используя ФСБ с 0,05 % БСА.

ii) 25 мкл антигена ВГБК, содержащего 8 единиц ГА, добавляют в каждую лунку и инкубируют планшет при 25 °C в течение 30-60 минут.

iii) 25 мкл человеческих эритроцитов группы O в концентрации 2-3 % добавляют в каждую лунку и дают отстояться при 25 °C в течение 30-60 минут.

iv) При каждом тестировании антиген титруют, чтобы убедиться, что было использовано 8 ГА /25 мкл, и включают положительный и отрицательный контроль сыворотки.

Титр сыворотки - это разведение до конечной точки, показывающее ингибирование ГA. Положительный порог сывороточных титров коррелирует с титром отрицательных контрольных сывороток; обычно он находится в диапазоне 1/20-1/80.

Как и в случае с тестом на ГA (см. 2.5), сложность получения клеток человеческой крови группы O и работы с ними привела к тому, что данный тест был заменен серологическим или методом определения антител.

**2.11 Конкурентный иммуноферментный анализ**

Антиген: Как следствие недавнего обнаружения ВГБК2 серология ГКБ должна основываться на использовании двух антигенов - классического ВГБК и ВГБК2.

Антиген готовят, как описано ранее для ИГ (см. 2.10), соблюдая осторожность при хранении его при температуре минус 20 °C в присутствии 50 % глицерина (об/об) для предотвращения замораживания. При необходимости вирус можно инактивировать перед добавлением глицерина, используя 1,0 % бинарный этиленимин (БЭИ) при температуре   
33 °C в течение 24 часов. Антиген предварительно титруют в ИФA, а затем используют в качестве ограничивающего реагента, т.е. в разведении, соответствующем 60-70 % высоты плато (значение поглощения при 492 нм в диапазоне 1,1-1,3).

Анти-ВГБК сыворотка: специфические поликлональные сыворотки с высоким титром анти-ВГБК или анти-ВГБК2 получают различными способами. Двумя возможными и используемыми в настоящее время методами являются следующие:

i) Кроликов старше 10 недель вакцинируют вакциной, гомологичной поликлональной сыворотке, которую необходимо получить (ВГБК или ВГБК2). Для получения сывороток, содержащих высокий уровень анти-ВГБК IgG, через 8 дней им перорально вводят 2 мл   
10 % гомогената печени, положительного на ВГБК или ВГБК2, разведенного 1/20 в ФСБ. У кроликов берут кровь через 35-45 дней после заражения, чтобы получить сыворотку реконвалесцентов (титр в кИФА составляет около 1/10240). В качестве альтернативы, кроликов реконвалесцентов повторно инфицируют через 3-4 месяца и через 10-15 дней берут кровь для получения гипериммунных сывороток ВГБК. В случае ВГБК2 для получения иммунных сывороток с высоким титром рекомендуется использовать штаммы, идентифицированные начиная с 2015 года (т.е. высоковирулентные изоляты).

ii) Антигены (ВГБК или ВГБК2) очищают из печени естественно или экспериментально инфицированных кроликов, которые умерли от острой формы заболевания (между 28 и 40 часами после заражения), используя один из опубликованных методов (Capucci et al., 1991; 1995; Ohlinger et al., 1990). Затем очищенный антиген ВГБК используют для иммунизации овец, коз или кур в соответствии с классическими протоколами с использованием масляных адъювантов. Такая же процедура может быть использована и для инокуляции кроликов, если перед инокуляцией очищенный вирус инактивируют.

Вместо поликлональных сывороток для кроликов можно использовать анти-ВГБК МАТ. Очистку кроличьего IgG и конъюгацию с КПОХ проводят в соответствии со стандартными протоколами. Конъюгированное антитело титруют в сэндвич-ИФА в присутствии и в отсутствие антигена ВГБК (печень кролика с отрицательным результатом). Затем его используют в самом высоком разведении, демонстрирующем максимальную (высокий уровень плато) абсорбцию (если сыворотка имела хороший анти-ВГБК титр, значение конъюгата КПОХ должно составлять от 1/1000 до 1/3000).

Контрольные сыворотки: отрицательную сыворотку берут у кроликов, полностью восприимчивых к заражению ВГБК. Положительная сыворотка - это либо сыворотка реконвалесцентов, разведенная 1/100 в отрицательной сыворотке, либо сыворотка, взятая у вакцинированного животного.

2.11.1 Порядок проведения теста (образец)

Примечание - Данная процедура также действительна для ВГБК2 с использованием гомологичных реагентов.

i) Кроличью сыворотку против ВГБК, разведенную до заданного титра, например 1/5000 в 0,05 М карбонатном/бикарбонатном буфере, рН 9,6, адсорбируют на микропланшете с высокой адсорбционной способностью (например, иммунопланшет Nunc Maxisorb) при температуре 4 °C в течение ночи.

ii) Планшет моют три раза по 3-5 минут каждый раз в ФСБ, рН 7,4, с 0,05 % раствором Твин 20 (ФСБТ). Если планшеты не используются сразу, их хранят закрытыми в пластиковом пакете в течение 1 месяца при температуре минус 20 °C.

iii) 25 мкл/лунку ФСБТ с 1 % дрожжевым экстрактом (ФСБТД) или 1 % БСА (ФСБТ-БСА) распределяют по всем необходимым лункам на планшете (см. ниже). 7 мкл первого образца сыворотки добавляют в первые две лунки (A1 и B1), 7 мкл второй сыворотки во вторые две лунки (C1 и D1) и продолжают с третьей (E1 и F1) и четвертой (G1 и H1) сыворотками, завершая, таким образом, первый ряд. Если необходимы качественные данные (положительные/отрицательные), операцию повторяют во втором ряду с образцами сывороток с 5 по 8, а в третьем ряде с образцами сывороток с 9 по 12 и так далее. Если необходимо определить титр сыворотки, сыворотку дополнительно разбавляют. Планшет перемешивают, а затем с помощью восьмиканальной микропипетки переносят 7 мкл из лунок в ряде 1 в лунки в ряде 2. Это соответствует четырехкратному разведению сыворотки. Эту последнюю операцию можно повторить один раз (титр 1/160), дважды (титр 1/640) или четыре раза (титр 1/10,240). Либо в случае тестирования сывороток для получения качественных данных (однократное разведение), либо для получения окончательного титра (несколько разведений) каждый планшет заполняют, оставив свободными 12 лунок для контрольной сыворотки. 7 мкл положительных сывороток добавляют в лунки G7 и H7 и 7 мкл отрицательных сывороток в лунки G10 и H10, затем разводят их один и два раза (1/40-1/160).

iv) 25 мкл/лунку антигена, суспендированного в ФСБТД, добавляют во все лунки на планшете в разведении, которое вдвое превышает расчетное разведение, как описано выше в разделе «Антиген» (смотреть первую часть этого описания метода).

v) Планшет инкубируют при температуре 37 °C на качающейся платформе в течение 50-60 минут.

vi) Планшет моют способом, описанным в пункте ii.

vii) 50 мкл/лунку кроличьего IgG анти-ВГБК, конъюгированного с КПОХ, добавляют в определенном разведении, как описано выше в разделе «Анти-ВГБК сыворотка» (смотреть первую часть этого описания теста).

viii) Планшет инкубируют при температуре 37 °C на качающейся платформе в течение 50-60 минут и промывают, как описано в пункте ii, добавив четвертую промывку продолжительностью 3 минуты.

ix) 50 мкл/лунку ОФД используют в качестве донора водорода при следующих условиях: 0,5 мг/мл OФД в 0,15 М фосфатном/цитратном буфере, рН 5 и 0,02 % H2O2. Реакцию останавливают через 5 минут добавлением 50 мкл/лунка 1 м H2SO4.

x) Данные снимают с планшета на спектрофотометре, используя фильтр с длиной волны 492 нм.

Сыворотка считается отрицательной, когда значение поглощения при первом разведении (1/10) уменьшается менее чем на 15 % от контрольного значения (разведение 1/10 отрицательной контрольной сыворотки), при этом она считается положительной, когда значение поглощения уменьшается на 25 % или более. Когда значение поглощения при разведении 1/10 уменьшается на 15-25 % от контрольного значения, сыворотка считается сомнительной.

Титр сыворотки соответствует разведению, дающему значение поглощения, равное 50 % (±10) от среднего значения трех отрицательных разведений сыворотки. Будет найден широкий диапазон титров, в зависимости от происхождения образца. Количество положительных сывороток колеблется от 1/640 до 1/10,240 у кроликов реконвалесцентов, от 1/80 до 1/640 у вакцинированных кроликов и от 1/10 до 1/160 при «непатогенной» инфекции. Знание происхождения образца позволяет сделать выбор между тестированием одного или нескольких разведений. Тестирование только первого разведения дает положительный или отрицательный результат. Титр устанавливается путем тестирования всех разведений, вплоть до шестого.

Вышеуказанные критерии, используемые для преобразования исходных данных ИФА в окончательные серологические результаты, одинаковы для кИФА ВГБК и ВГБК2. Однако для практической интерпретации полученных результатов необходимо иметь в виду некоторые соображения. Основной из них заключается в том, что ВГБК и ВГБК2, хотя и представляют собой два различных серотипа, имеют общие вторичные антигенные детерминанты. Эти детерминанты индуцируют незначительное подмножество перекрестнореактивных антител, которые, хотя и имеют ограниченное значение для защиты от ГБК, «вмешиваются» в реакции ИФА. Это означает, что кролики, вакцинированные (или инфицированные) ВГБК, будут иметь средние или высокие титры в гомологичном кИФA, но будут в некоторой степени положительными в гетерологичном кИФA (кИФA ВГБК2). Обратное также верно, когда кроликов вакцинируют или заражают ВГБК2 и тестируют на кИФA ВГБК. Однако, чтобы установить, какая вакцина была использована (или какой вирус заразил кроликов) возможно, можно использовать значение, полученное путем «соотношения» титра кИФА ВГБК2, деленного на титр кИФА ВГБК (значение RT2) (Velarde et al., 2017). Это значение обычно колеблется от 4 до 64 у кроликов, вакцинированных или инфицированных ВГБК2, и от 0,25 до 0,0156 у кроликов, вакцинированных или инфицированных ВГБК. При значении RT2 от 2 до 0,5 невозможно определить происхождение обнаруженных антител к тому или иному вирусу. Это может произойти, когда оба титра низкие (<1/80) или когда кроликов вакцинируют двухвалентной вакциной (ВГБК плюс ВГБК2) или двумя ассоциированными вакцинами (ВГБК и ВГБК2).

Из-за значительных антигенных различий, существующих между ВГБК и ВСЕЗР, описанные выше серологические методы, в которых в качестве антигена используется ВГБК, не рекомендуются для серологической диагностики СЕЗР. Тем не менее, для выявления положительных и отрицательных сывороток кролика можно было бы использовать прямой метод ИФА; фактически, адсорбция ВГБК на твердой фазе микропланшета ИФА выявляет перекрестно реагирующие антигенные детерминанты. Альтернативно, специфический кИФA для ВСЕЗР может быть получен аналогичным образом, используя специфический реагент (антиген и антисыворотку), приготовленный, как описано выше, для ВГБК.

**2.12 Изотопный иммунноферментный анализ (изоИФА)**

ИзоИФА позволяют обнаруживать и титровать изотипы IgA, IgM и IgG. Титры изотипов имеют решающее значение для интерпретации результатов полевой серологии в четырех основных областях: перекрестнореактивные антитела, естественная резистентность молодых кроликов, материнские антитела и антитела у ранее инфицированных кроликов (Cooke et al., 2000). Фактически, в случае пассивных антител обнаруживаются только IgG; у вакцинированных животных обычно не обнаруживаются IgA, а у недавно инфицированных кроликов сначала обнаруживаются IgM, а затем IgA и IgG (Cooke et al. 2000).

Для выявления ВГБК-специфичных IgG один ВГБК-специфичный МАТ адсорбируют на планшете в концентрации 2 мкг/мл методом, описанным выше для поликлональной сыворотки в кИФA (см. перечисление i 2.11.1). Вирус добавляют на планшеты в концентрации, удвоенной по сравнению с концентрацией, используемой в кИФA, и после инкубации и промывки добавляют сыворотки и последовательно разбавляют четыре раза, начиная с 1/40. Конъюгат КПОХ анти-кроличьего IgG МАТ используют для выявления IgG, связанного с вирусом. Заключительным этапом получения изоИФА для IgG, lgM и IgA является добавление ОФД и H2SO4, как и для кИФА. Для выявления изотипов IgM и IgA фазы реакции ИФА инвертируют, чтобы избежать конкуренции с IgG, который обычно является преобладающим изотипом. Анти-кроличий IgM или анти-кроличий IgA МАТ адсорбируют в лунках, а затем сыворотки разбавляют, как описано выше. Затем следует инкубация с антигеном, а затем КПОХ-конъюгированный МАТ используют для обнаружения ВГБК, связанного с планшетом. Сыворотки считают положительными, если значение OD492 (оптической плотности) при разведении 1/40 больше чем на 0,2 ед. оптической плотности (два стандартных отклонения) превышает значение отрицательной сыворотки, используемой в качестве контроля. Титр каждой сыворотки берут в качестве последнего разведения, дающего положительное значение. Поскольку тесты на изотипирование не проводят по идентичной методике, эквивалентные титры не означают, что изотипы присутствуют в одинаковых количествах. Этот метод может быть применен также для серологии с ВГБК2, очевидно, с использованием MAТ, специфичных для ВГБК2.

**3 Требования к вакцинам**

**3.1 Исходные сведения**

В странах, где ГБК является эндемичным, косвенный контроль заболевания у сельскохозяйственных животных и домашних кроликов достигается путем вакцинации с использованием соответствующего типа вакцины - той, которая готовится из осветленной суспензии печени экспериментально инфицированных кроликов и которую впоследствии инактивируют и вводят адъювант. Методы инактивации (формальдегид, бета-пропиолактон или другие вещества) и используемые вспомогательные вещества (неполноценное минеральное масло, гидроксид алюминия или другие эмульсии) могут варьироваться в зависимости от протокола, используемого различными производителями.

Уровень перекрестной защиты, вызванный вакцинацией вакциной ВГБК/ВГБКа против ВГБК2, является низким и не предотвращает инфекцию и потери из-за клинического заболевания. Следовательно, следует использовать комбинированную вакцинацию обоими типами антигенов и/или вакцинами, гомологичными типу ВГБК, выявленному во время эпидемий или вспышек. Учитывая текущую изменчивость штаммов ВГБК2, крайне желательно использование вакцин на основе штаммов, демонстрирующих высокую гомологию со штаммами, циркулирующими в данной местности/регионе/стране.

Большинство производителей вакцин рекомендуют однократную базовую вакцинацию с ежегодной вторичной инъекцией. Обычно дозу в 1 мл вводят подкожно в область шеи или внутримышечно. В тех подразделениях, где в анамнезе не было случаев заболевания, с отрицательной серологией на ГБК, рекомендуется вакцинировать только племенное поголовье. Учитывая высокий уровень пополнения запасов на промышленных кролиководческих фермах, обычная программа вакцинации заключается в введении вакцины всем производителям, независимо от их возраста, каждые 6 месяцев. Это должно гарантировать, что все животные получают по крайней мере одну вакцинацию в год. Для обеспечения соответствующего уровня защиты настоятельно рекомендуется повторная вакцинация, хотя экспериментальные данные показывают, что защита обычно сохраняется в течение длительного времени (более 1 года).

Учитывая короткий жизненный цикл (приблизительно 80 дней) кроликов на откорме и их естественную устойчивость, вплоть до возраста 6-8 недель, к заболеванию, вызываемому ВГБК/ ВГБКа, но не ВГБК2, вакцинация этих кроликов не является необходимой, если ситуация на ферме нормальная, т.е. приняты надлежащие меры биозащиты, и в этом районе нет вспышек заболевания. После вспышки ГБК, и особенно в случае ВГБК2, которая может вызвать заболевание даже у молодых животных, даже при соблюдении строгих гигиенических мер, включая очистку и дезинфекцию, безопасную утилизацию туш и интервал перед пополнением запасов, настоятельно рекомендуется вакцинировать мясных животных в возрасте 30-40 дней, так как частота повторного заражения очень высока. Только после нескольких (>3) производственных циклов рекомендуется прекратить вакцинацию мясных животных. Чтобы убедиться в персистенции инфекционного ГБК внутри помещения, не следует вакцинировать различное количество кроликов, начиная с небольшой контрольной группы.

Учитывая, что иммунитет появляется примерно через 7-10 дней, вакцинацию также можно считать довольно эффективным постконтактным лечением. В некоторых ситуациях, в частности, это может быть включено в стратегии реагирования на чрезвычайные ситуации, применяемые при возникновении ГБК на фермах, имеющих отдельные сараи и где применяются надлежащие меры биозащиты. Действительно, лучших результатов в ограничении распространения заболевания и снижении экономических потерь можно было бы добиться при использовании серотерапии путем парентерального введения анти-ВГБК гипериммунных сывороток, которые обеспечивают быструю, но недолговечную защиту от заражения ВГБК. В обеих ситуациях (вакцинация с последующим постконтактным лечением и пассивная защита гипериммунными сыворотками) необходимо использовать вакцину и сыворотки, гомологичные возбудителю штамма ВГБК. Это особенно верно в случае ВГБК2, учитывая слабую перекрестную защиту, достигаемую классическими вакцинами на основе ВГБК/ВГБКa.

Вакцину следует хранить при температуре 2-8 °C, ее не следует замораживать или подвергать воздействию яркого света или высоких температур.

**3.2 Основной принцип производства и минимальные требования к традиционным вакцинам**

3.2.1 Характеристики посевного вируса

3.2.1.1 Биологические характеристики основного посевного вируса

В настоящее время, репликация ВГБК может быть вызвана только заражением восприимчивых животных. Следовательно, источником посевного вируса для производства инактивированных тканевых вакцин являются инфицированные гомогенаты печени, полученные путем последовательных переносов у кроликов, которым была привита частично очищенная вирусная суспензия ГБК. Кроликов, используемых для прививки, отбирают из колоний, которые, как показали периодические серологические исследования, здоровы и восприимчивы к заболеванию. При получении печени для вакцины ВГБК2 может возникнуть большая вариабельность из-за разного уровня смертности, зарегистрированного при экспериментальных инфекциях, в зависимости от вирулентности используемого штамма.

3.2.1.2 Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних веществ)

Частично очищенную вирусную суспензию ГБК получают центрифугированием 1/5 печеночной суспензии (об/об) в ФСБ при 10 000 g в течение 20 минут при 4 °C. Полученный супернатант обрабатывают 8 %-ным (об/об) полиэтиленгликолем (PEG 6000) в течение ночи при температуре 4 °C. Осадок повторно суспендируют при разведении 1/10 в ФСБ, а затем центрифугируют при 10 000 g в течение 20 минут при 4 °C. Супернатант ультрацентрифугируют при 80 000 g в течение 2 часов при температуре 4 °C через   
20 %-ный сахарозный раствор. Осадок повторно суспендируют в ФСБ (1/100 от исходного объема).

Затем эту вирусную суспензию характеризуют любым из следующих методов: ЭМ-исследование с отрицательным окрашиванием, определение реактивности в ИФА с различными специфическими МАТ и активность ГА при комнатной температуре (титр ГА в отношении человеческих эритроцитов группы О выше, чем 1/1280).

Отсутствие жизнеспособных бактерий или грибков определяют с помощью общепринятых лабораторных бактериологических методов. Методы ПЦР могут быть использованы для выявления микоплазмы и специфичных для кроликов посторонних вирусов (например, вируса миксомы).

Посевной вирус контролируют путем прямой посев восприимчивым кроликам с последующей оценкой клинических признаков в ходе экспериментального заражения. Подходящий посевной вирус должен вызывать различную смертность среди животных в зависимости от типа штаммов, т.е. 70-80 % кроликов в случае ВГБК/ВГБКа и до 80 % в случае ВГБК2 в зависимости от вирулентности штамма, в течение 24-96 часов после посева, при поражении внутренних органов, характерные для ГБК. Для подтверждения результатов теста следует провести общее и гистопатологическое обследование всех кроликов, чтобы исключить интеркуррентные заболевания.

Посевной вирус титруют перед использованием, и он должен содержать не менее 105 LD50 (средняя смертельная доза). Его следует хранить замороженным (минус 70 °C), лучше с добавлением глицерина в соотношении 1:1 по объему или лиофизированным.

3.2.1.3 Валидация в качестве вакцинного штамма

Из-за отсутствия эффективной перекрестной защиты при использовании гетерологичных вакцин (например, ВГБК/ВГБКа против ВГБК2) для приготовления вакцины рекомендуется использовать те штаммы, которые в высокой степени гомологичны доминирующему серотипу ВГБК, вызывающему вспышки в определенной местности.

Также важно иметь современные и гомологичные контрольные вакцины из-за индуцированного иммунитета в отношении выраженного антигенной особенности полевых штаммов.

3.2.1.4 Процедура предварительного принятия нового основного посевного вируса

Текущие эпидемиологические данные ясно показывают, что вакцина ВГБК2 практически вытеснила классическую вакцину ВГБК, и, таким образом, существует растущий спрос на вакцины ВГБК2. Поскольку ВГБК2 является «новым» формирующимся вирусом, а не просто генетическим вариантом ВГБК/ВГБКа, с 2010 года он претерпел значительную эволюцию, что привело к изменениям вирулентности и антигенного характера (Capucci et al., 2017). Как следствие, рекомендуется выбрать в качестве основного посевного материала для производства вакцины один из штаммов, выделенных начиная с 2015 года, и основывать отбор на их антигенном характере.

Когда популяция диких и домашних кроликов быстро приобретают высокий коллективный иммунитет против ВГБК2, они одновременно теряют какую-либо защиту от классических штаммов ВГБК/ВГБКа, которые не исчезли полностью. Этот факт следует учитывать при разработке систем эпиднадзора за ГБК, чтобы страны могли быть готовы оперативно реагировать на эпизоотии путем обновления состава вакцин.

3.2.2 Метод производства

3.2.2.1 Порядок производства

Порядок изготовления вакцины для обоих типов антигенов (ВГБК и ВГБК2) осуществляется по аналогичному протоколу. После посева восприимчивых кроликов собирают печень и селезенку тех кроликов, которые умирают в период от 24 до 96 часов после посева. Кролики, которые умерли позже, отклоняют. Органы измельчают в 1/10 (м/об.) стерильного ФСБ, рН 7,2-7,4, и смесь гомогенизируют в течение 10 минут в смешивателе в охлажденном помещении. Затем смесь обрабатывают 2%-ным раствором хлороформа (18 часов при 4 °C) с последующим центрифугированием при 6000 g в течение 1 часа при 4 °C. Супернатант собирают непрерывной откачкой под высоким давлением и впоследствии инактивируют. Вирусную суспензию анализируют с помощью ГA-теста и ИФА, и, как только известно количество единиц ГA от первоначального титрования, добавляют больше стерильного ФСБ в объеме, достаточном для обеспечения, после инактивации и адсорбции/добавления адъюванта, концентрации 640-1280 единиц ГA/мл в коммерческом продукте. Различные средства доказали свою эффективность в борьбе с вирусной инфекцией. Наиболее часто используются формальдегид и бета-пропиолактон, которые могут использоваться в различных концентрациях и температурах, в течение различных периодов времени, а также в комбинации. Во время инактивации рекомендуется непрерывно перемешивать жидкость. Затем в вакцину в качестве адъюванта вводят гидроксид алюминия, неполный адъювант Фрейнда или другую масляную эмульсию. В довершение добавляют консервант тиомерсал (мертиолат) в разведении 1/10 000 (об./об.) перед разливом по бутылкам.

3.2.2.2 Требования к компонентам

Поскольку вирус не может быть выращен in vitro, единственными требованиями являются те, которые касаются инфицированных животных. Кролики не должны быть заражены вирусом ВГБК и миксоматозом, а также не должны иметь антител против ВГБК, включая перекрестно-реактивные антитела, индуцированные непатогенным калицивирусом кроликов (КВК), связанным с ВГБК.

Животные (в возрасте не менее 4 месяцев) по прибытии содержат на строгом карантине в отдельном помещении и выращивают в удовлетворительных и биозащищенных санитарных условиях [33].

Размножение посевного вируса и производство партий вакцин основаны на одном протоколе экспериментального заражения, включающем внутримышечное введение дозы не менее 100 LD50.

3.2.2.3 Внутрипроизводственный контроль

i) Содержание антигена

Титр ВГБК определяют перед инактивацией путем расчета титра ГA, который должен быть выше 1/1280, и реактивности ИФA. Оба значения повторно определяют после инактивации и адсорбции/добавления адъюванта. Идентичность ГБК также может быть подтверждена с помощью ЭМ-анализа с отрицательным окрашиванием или ОТ-ПЦР-анализа в реальном времени.

ii) Стерильность

Органы тестируют на наличие жизнеспособных бактерий, вирусов, грибков или микоплазмы в соответствии с протоколом, используемым для тестирования основного посевного вируса. Раствор ФСБ и гель гидроксида алюминия стерилизуют в автоклаве; масляную эмульсию стерилизуют нагреванием при температуре 160 °C в течение 1 часа.

iii) Инактивация

Перед введением адъюванта необходимо продемонстрировать, что инактивирующее вещество и процесс инактивации инактивируют вирус вакцины в условиях производства. Таким образом, тест проводят на каждой партии объема собранного материала, а также на конечном продукте.

Тридцать взрослых кроликов (возраст >4 месяцев) используют в трех группах   
по 10 кроликов. Первой и второй группам вводят концентрированный антиген и держат под наблюдением в течение 15 и 7 дней соответственно. Вторую группу гуманно убивают через 7 дней. Третьей группе вводят печень кроликов из второй группы и держат под наблюдением в течение 21 дня. Доза посевного материала, вводимого парентерально (внутримышечно или подкожно), составляет 1 мл концентрированного антигена (преципитация ПЭГ), что соответствует по меньшей мере 10 дозам (ГA больше 20480). Период наблюдения составляет: 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 каких-либо клинических признаков. Печень должна дать отрицательные результаты при использовании теста на ГA и сэндвич-ИФA. Кролики, которым привили антиген, должны иметь положительный серологический титр (например, больше 1/80 с использованием метода кИФA, специфичного для гомологичного вируса), а те, кому ввели печень, полученную после первого переноса, должны быть серологически отрицательными.

3.2.2.4 Тестирование партии конечного продукта

Тестирование на безопасность для серийного выпуска не требуются, за исключением случаев с аутогенными вакцинами. Тесты на стерильность и иммуногенность следует проводить на каждой партии готовой вакцины; тесты на продолжительность иммунитета следует проводить один раз с использованием типичной партии вакцины, а тесты на стабильность следует проводить на трех партиях.

i) Стерильность/степень гомогенности

Каждую партию вакцины тестируют на наличие жизнеспособных бактерий, вирусов, грибков или микоплазмы в соответствии с тем же протоколом, который рекомендован для тестирования основного посевного вируса.

iii) Безопасность

Там, где требуются испытания на безопасность, следует выполнить следующую процедуру:

a) Безопасность введения одной дозы;

b) Безопасность введения передозировки (по крайней мере, двух доз инактивированной вакцины);

c) Безопасность повторного введения одной дозы.

Тест проводят для каждого утвержденного способа введения. Используют не менее   
10 взрослых (старше 4 месяцев), у которых нет антител к ВГБК. Наблюдают за этими животными в течение 21 дня, оценивая следующие жизненные параметры: общее состояние и реакции, сенсорное состояние, потребление воды и пищи, характеристики фекалий и местные аномальные реакции в месте прививки. Регистрируют температуру тела за день до вакцинации, во время вакцинации, через 4 часа после вакцинации, а затем ежедневно в течение 4 дней; отмечают максимальное повышение температуры для каждого животного. Возникновение аномальных местных или системных реакций не должно; среднее повышение температуры тела не должно превышать 1 °C, а также ни у одного животного температура не должна повышаться более чем на 2 °C. Может возникнуть местная реакция, длящаяся менее 21 дня. Если вакцина предназначена для использования у беременных кроликов, вакцину вводят не менее 10 беременным кроликам в соответствии с рекомендованным графиком. Период наблюдения продлевают до 1 дня после родов. Самка кролика должна оставаться здоровой, и не должно быть аномальных местных или системных реакций. Не следует отмечать никаких неблагоприятных последствий для беременности или потомства.

iii) Специфичная активность партии

Используют восприимчивых взрослых кроликов (возраст больше 4 месяцев), не имеющих антител против ВГБК и выращенных в подходящих условиях изоляции, чтобы гарантировать отсутствие контакта с ВГБК. Пять кроликов вакцинируют одной полной дозой вакцины, вводимой рекомендованным способом. Две другие группы по пять животных в каждой вакцинируют 1/4 и 1/16 от полной дозы соответственно.

Четвертую группу из пяти невакцинированных кроликов содержат в качестве контрольной. Всем животным не менее чем через 21 день после вакцинации вводят внутримышечно дозу ВГБК, содержащую не менее 100 LD50 или имеющую титр ГА выше 1/2560. Наблюдают за кроликами еще в течение 21 дня. Тест недействителен, если: а) в период между вакцинацией и заражением более 10 % вакцинированных или более 20 % контрольных кроликов проявляют аномальные клинические признаки или умирают от причин, не связанных с вакциной; б) после заражения ВГБК/ ВГБКа, менее 60 % контрольных кроликов умерли с типичными признаками ГБК; или в) после заражения ВГБК2, менее 20 % контрольных кроликов умерли, и менее 60 % из них показали высокие титры антител (>1/1280 при использовании гомологичного кИФА). Вакцина соответствует тесту, если: а) не менее чем у 80 % вакцинированных кроликов нет признаков ГБК;   
б) средний уровень антител у вакцинированных животных не значительно ниже уровня, зафиксированного в тесте на защитные антитела, проведенном с использованием в качестве вакцины инактивированного посевного вируса.

3.2.3 Требования для разрешения регуляторного органа

После розлива и упаковки необходимо провести тесты на безопасность, эффективность и стерильность конечного продукта. Таким образом, важно, чтобы эти два последних этапа производства выполнялись в соответствии со стандартизированными надлежащими производственными процедурами. Тесты проводят путем отбора образцов из статистически определенного количества случайно взятых многодозовых контейнеров   
(20, 50 или 100 доз) вакцины.

3.2.3.1 Процесс производства

Для утверждения вакцины все соответствующие сведения, касающиеся производства вакцины и тестирования контроля качества (см. 3.2.1 и 3.2.2), должны быть представлены компетентным органам. Эту информацию предоставляют по трем последовательным партиям вакцин объемом не менее 1/3 от типичного объема промышленной партии.

3.2.3.2 Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Кролик является единственным видом, восприимчивым к ВГБК (за исключением некоторых видов кроликов, восприимчивых к ВГБК2), и в интересах благополучия животных тесты проводят только на целевых животных. Требования к безопасности конечного продукта для кроликов подтверждают в ходе полевых исследований, как на откормочных, так и на племенных кроликах. Следует использовать не менее 30 кроликов-производителей в возрасте больше 4 месяцев и 70 кроликов в возрасте 30-45 дней. Кроликов-производителей вакцинируют подкожно в заднюю часть шеи дважды (с интервалом в 3 недели) одной дозой. Кроликов на откорме вакцинируют либо в 30-дневном, либо в 45-дневном возрасте. За животными наблюдают в течение 4 месяцев с момента первой вакцинации. Непривитых животных содержат в качестве контрольных.

Контроль безопасности вакцины у кроликов-производителей осуществляют путем оценки их репродуктивных показателей. Учитывают следующие параметры: местные или общие реакции; общее количество родившихся кроликов и количество живых крольчат; процент смертности на момент отлучения от груди; средний вес молодняка крольчат в период отлучения от груди; ежедневное потребление корма. Контроль безопасности вакцины у кроликов на откорме осуществляют путем оценки их ежедневного состояния здоровья. Учитывают следующие параметры: местные или общие реакции; индивидуальная прибавка в весе после отлучения от груди (30 дней) и каждые 15 дней; ежедневное потребление корма; индекс фаговой конверсии; смертность в период откорма. У вакцинированных кроликов не должно наблюдаться никаких изменений в их общем состоянии здоровья или аномальных местных или системных реакций в течение всего срока проведения теста.

ii) Реверсия вирулентности для ослабленных/живых вакцин

Не применимо.

iii) Предупредительные мероприятия

Вакцина не должна содержать компоненты, которые могут представлять опасность для потребителей вакцинированных кроликов. Однако, поскольку инактивированная вакцина содержит адъювант из минерального масла, существует связанный с этим риск, который может возникнуть в результате случайной самоинъекции. Случайная инъекция может вызвать сильный отек и серьезные последствия, если своевременно не обратиться за квалифицированной медицинской помощью.

Во время полевых испытаний безопасности и эффективности следует проверять и регистрировать взаимодействие с другими вакцинами (например, вакциной против миксоматоза) или фармацевтическими продуктами (лечебные корма, содержащие антибиотики против респираторных заболеваний и бактериального энтерита). На сегодняшний день сообщений о каких-либо взаимодействиях не поступало.

Инактивированная вакцина не распространяется в окружающей среде, и в предыдущих тестах не было обнаружено признаков проблем с экотоксичностью вирусных антигенов. Риск экотоксичности, вызванной применением вакцины, равен нулю из-за природы вакцины (инактивированная вакцина для парентерального применения). Вакцина не содержит компонентов, которые могли бы представлять опасность для окружающей среды. Кроме того, вакцина вводится путем инъекции, поэтому загрязнение окружающей среды маловероятно. Для достижения высочайшего уровня безопасности в соответствии с правилами надлежащей гигиены флаконы после использования необходимо окунуть в раствор антисептика.

3.2.3.3 Требования к эффективности

Эффективность проверяют в лаборатории как с помощью контрольных, так и серологических тестов. Двадцать кроликов (10 вакцинированных и 10 невакцинированных) в возрасте не менее 4 месяцев заражают вирулентным вирусом: по меньшей мере 90 % вакцинированных животных должны иметь защиту, давая положительные серологические титры, а доля контрольных невакцинированных животных аналогична той, которая регистрируется естественным путем в зависимости от типа штамма (т.е. 70-90 % для ВГБК и 50-80 % для ВГБК2), должна умереть в течение периода наблюдения.

Эффективность вакцины в полевых условиях может быть определена путем оценки сероконверсии в образцах крови, взятых как у кроликов на откорме, так и у племенных кроликов в разных контрольных точках после вакцинации. Титры измеряют с помощью C-ИФА и ИФА антиизотипных IgM, IgA и IgG, используя специфические и гомологичные методы в зависимости от типа вируса (ВГБК/ВГБКa или ВГБК2).

Перед первой вакцинацией C-ИФA должны подтвердить у всех кроликов отсутствие антител против ВГБК. У вакцинированных животных защитный иммунитет против ВГБК развивается за короткий промежуток времени: в сыворотке инфицированных животных циркулирующие антитела присутствуют всего через 3-4 дня после заражения (IgM и IgA), тогда как у кроликов, вакцинированных инактивированной адъювантной вакциной, первые антитела обычно появляются через 7-10 дней (только IgM). IgG появляются примерно через 15-20 дней. После вакцинации выработка IgA очень низкая или вообще отсутствует. Поскольку он вырабатывается только при заражении живым вирусом после орально-назальной диссеминации, IgA можно рассматривать как маркер контакта с полевым вирусом. Иммунная система слизистой оболочки также может быть вовлечена в защиту от заболевания, даже если вакцина вводится парентерально, а не перорально. На это указывают эксперименты с пероральным введением вакцины у вакцинированных кроликов, когда в сыворотке очень быстро появляются IgA, но не IgM. Это означает, что В-клетки памяти, способные продуцировать IgA, уже присутствуют на уровне слизистой оболочки, которая обычно является первым местом репликации ВГБК.

Существует определенная корреляция между титрами, полученными с помощью C-ИФA, и состоянием защиты от заболевания, вызванного различными штаммами (см. 2.11), принимая во внимание найденное значение RT2, т.е. кролики с титрами антител, специфически индуцированными одним штаммом (ВГБК/ВГБКа/ВГБК2) не проявляли признаков заболевания при заражении тем же вирулентным штаммом. У кроликов реконвалесцента серологические титры могут достигать 1/20480, тогда как у вакцинированных кроликов они обычно составляют от 1/40 до 1/640 в зависимости от времени, прошедшего с момента вакцинации. Материнские антитела (только IgG) обычно исчезают в течение 30 дней у молодых кроликов, рожденных от вакцинированных здоровых самок, но они сохраняются дольше (до 45-55-дневного возраста), когда кролики рождаются от самок реконвалесцента, поскольку пассивные титры молодняка напрямую связаны с титрами их матерей. Это верно для молодых кроликов с промышленных ферм, которых отнимают от груди довольно рано (в возрасте 25-35 дней), тогда как у молодых диких кроликов материнские антитела могут сохраняться в течение 80 дней. У молодых кроликов (возраст <35-40 дней) низкий уровень антител (1/80-1/320) также может быть вызван активной инфекцией ВГБК/ВГБКа, не приводящей к заболеванию, как это обычно происходит у животных этого возраста.

3.2.3.4 Продолжительность иммунитета

Данные, приведенные в литературе, указывают на длительную продолжительность иммунитета, индуцированного однократной вакцинацией (до 15 месяцев). Через 9-12 месяцев после вакцинации титры в 2-4 раза ниже, чем наблюдались через 2-3 недели после вакцинации. Бустер-эффект в случае естественной инфекции или повторной вакцинации зависит от времени, прошедшего с момента вакцинации, т.е. он ниже через 5-7 месяцев после вакцинации и выше у животных, вакцинированных до этого времени.

Чтобы точно определить продолжительность и эффективность иммунитета, рекомендуется провести следующий тест: 20 кроликов, вакцинированных однократно, делятся на четыре группы и проходят серологическое тестирование с месячными интервалами в течение 1 года. Каждой группе прививают вирулентный ВГБК   
через 3, 6, 9 месяцев или 1 год после вакцинации. Контрольное заражение должно приводить к усилению сероконверсии, которая напрямую связана со временем, прошедшим с момента вакцинации. Отсутствие клинических признаков заболевания и смертности подтверждает эффективность вакцины.

3.2.3.5 Стабильность

Должны быть представлены доказательства того, что вакцина проходит тест на эффективность в партии по истечении 3 месяцев после предполагаемого срока годности.

Для вакцины в контейнерах с несколькими дозами обычно требуется подходящий консервант. Следует проверить его персистенцию в течение всего срока годности.

**3.3 Вакцины, основанные на биотехнологии**

Проведено несколько исследований экспрессии корового белка ВГБК/ВГБКа/ВГБК2 в Escherichia coli, вирусе осповакцины и аттенуированном вирусе миксомы (ВМ). Более того, различными авторами было показано, что рекомбинантный коровый белок VP60, экспрессируемый в системе клеточной экспрессии бакуловируса/Sf9, самособирается в VPCH, которые структурно и антигенно идентичны вирионам ГБК. При этом слитый белок, экспрессируемый в E. Coli, обладает высокой степенью нерастворимости и низкой иммуногенностью, активная иммунизация может быть достигнута с помощью ВПЧ, полученных в бакуловирусной системе, или с помощью рекомбинантных вакцин против оспы, ВМ и оспы канареек, вводимых внутримышечно или перорально. В частности, кролики, вакцинированные рекомбинантным ВМ, экспрессирующим коровый белок ВГБК, были защищены от летальных исходов ВГБК и ВМ. Данный тип рекомбинантной живой вакцины, т.е. модифицированный вирус миксомы, экспрессирующий основной коровый белок ВГБК, был разработан и зарегистрирован и коммерчески доступен в нескольких странах для парентерального введения.

Структурный белок VP60 также экспрессировался в трансгенных растениях либо с помощью нового вектора (PPV-NK) на основе вируса оспы сливы (PPV), либо в трансгенных растениях картофеля под контролем промотора 35S вируса мозаики цветной капусты или модифицированного промотора 35S. В обоих случаях иммунизация кроликов экстрактами растений Nicotiana clevelandii, инфицированных химерой VP60 PPV-NK, и экстрактами листьев картофеля, несущих этот модифицированный промотор 35S, соответственно, индуцировала эффективную иммунную реакцию, который защищал животных от смертельного заражения ВГБК. Однако в настоящее время ни одна из этих вакцин не была зарегистрирована, и поэтому они не имеются в продаже.

Вакцина, представляющая собой комбинацию традиционной инактивированной вакцины ГБК, полученной из печени, и живой аттенуированной вакцины против вируса миксомы, которую можно вводить внутрикожно, была разработана во Франции и затем поступила на рынок в некоторых европейских странах.

**Библиография**

[1] КАПУЧЧИ Л., КАВАДИНИ П., СКЬЯВЕТТО М., ЛОМБАРДИ Г. и ЛАВАЦЦА А. (2017). Повышенная патогенность вируса геморрагической болезни кроликов 2-го типа (ВГБК2). Вет.зап., 180, 246. ИЦО: 10.1136/vr.104132

[2] КАПУЧЧИ Л., ФАЛЛАКАРА Ф., ГРАЦИОЛИ С., ЛАВАЦЦА А., ПАЧЧАРИНИ М.Л. и БРОККИ Э. (1998). Дальнейший шаг в эволюции вируса геморрагической болезни кроликов: появление первого единого антигенного варианта. *Исслед.вируса,* 58, 115-126.

[3] КАПУЧЧИ Л., ФРИГОЛИ Г., РОНШОЛТ Л., ЛАВАЦЦА А., БРОККИ Э. и РОССИ С. (1995). Антигенность вируса геморрагической болезни кроликов, изученная по его реактивности с моноклональными антителами. *Исслед.вируса,* 37, 221-238.

[4] КАПУЧЧИ Л., ФУЗИ П., ЛАВАЦЦА А., ПАЧЧАРИНИ М.Л. и РОССИ С. (1996). Обнаружение и первоначальная характеристика нового калицивируса кролика, родственного вирусу геморрагической болезни кроликов, но непатогенного. *Журнал вирусологии,* 70, 8614-8623.

[5] КАПУЧЧИ Л., ШИКЛУНА М.Т. и ЛАВАЦЦА А. (1991). Диагностика вирусной геморрагической болезни кроликов и синдрома европейского зайца-русака. Журнал «*Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.», 10, 347-370.*

[6] КАВАДИНИ П., МОЛИНАРИ С., ПЕЦЦОНИ Г., КЬЯРИ М., БРОККИ Э., ЛАВАЦЦА А. и КАПУЧЧИ Л. (2016). Идентификация нового непатогенного лаговируса у зайцев-русаков (*Lepus europeaus*). В: Материалах 5-й Всемирной конференции по лагоморфам, Калифорнийский государственный университет, Калифорния, США, 13 июля 2016 г.

[7] КОЛЛИНЗ Б.Дж., УАЙТ Дж.Р., ЛЕНГУАС С., БОЙД В. и УЭСТБЕРИ Х.А. (1995). Конкурентный ИФА на выявление антител к вирусу геморрагической болезни кроликов. *Ветеринарная микробиология*, 43, 85-96.

[8] КОЛЛИНЗ Б. Дж., УАЙТ Д. Р., ЛЕНГУАС К., МОРРИСИ С. Дж. И ВЕСТБЕРИ Х. А. (1996) Присутствие антигена вируса геморрагической болезни кролика в тканях кролика, выявленное с помощью моноклонального антителозависимого ИФА с захватом. *Журнал вирусологии, Методы,* 58, 145-154.

[9] КУК Б.Д., РОБИНСОН А.Дж., МЕРЧАНТ Дж.К., НАРДИН А. и КАПУЧЧИ Л. (2000). Использование ИФА в полевых исследованиях геморрагической болезни кроликов (ГБК) в Австралии. *Эпидемиология и инфекции* 124, 563-576.

[10] ДАЛТОН К.П., ПОДАДЕРА А., ГРАНДА В., НИЧЕЗА И., ДЕЛЬ ЛЬЯНО Д., ГОНСАЛЕС Р., ДЕ ЛОС ТОЙОС Дж.Р., ГАРСИЯ ОКАНА М., ВАСКЕС Ф., МАРТИН АЛОНСО Дж.М., ПРИЕТО Дж.М., ПАРРА Ф. и КАСАИС Р. (2018). ИФА для выявления антигена варианта вируса геморрагической болезни кроликов ВГБК2 в экстрактах печени. *Журнал вирусологии. Методы,* 251,38-42.

[11] ДРУЙЯР К., ЛЕМЕТР Э., ШАТЕЛЬ М., ГИТТОН Ж.-С., МАРШАНДО С., ЭТЕРРАДОССИ Н. и ЛЕ ГАЛЛ-РЕКЮЛЬ Г. (2018). Первая полная последовательность генома штамма калицивируса кролика, выделенного из *Lepus Europaeus*. *Доклады о ресурсах по микробиологии,* 7,e01224-18.

[12] ДУАРТЕ М.Д., КАРВАЛЬЮ К.Л., БАРРОС С.С., ЭНРИКЕС А.М., РАМОС Ф., ФАГУЛЬЯ Т., ЛУИС Т., ДУАРТЕ Э.Л. и ФЕВЕРЕЙРО М. (2015). ОТ-ПЦР TaqMan в режиме реального времени для выявления вируса геморрагической болезни кроликов 2 (ВГБК2). *Журнал вирусологии. Методы,* 219,90-95.

[13] ГАЛЛ А., ХОФФМАН Б., ТЕЙФКЕ Дж.П., ЛАНГЕ Б. и ШИРРМАЙЕР Х. (2007). Персистенция вирусной РНК у кроликов, которые преодолели экспериментальную ВГБК-инфекцию, выявленную с помощью высокочувствительной мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени. *Ветеринарная микробиология,* 120,17-32.

[14] ГУЛД А.Р., КАТТЕНБЕЛТ Дж.А., ЛЕНГХАУС С., МОРРИССИ С., ЧЕМБЕРЛЕН Т., КОЛЛИНЗ Б.Дж. и УЭСТБЕРИ Х.А. (1997). Полная нуклеотидная последовательность вируса геморрагической болезни кроликов (чешский штамм V351): использование полимеразной цепной реакции для выявления репликации у австралийских позвоночных и анализа вариабельности последовательности вирусного генома популяции. *Исслед.вируса,* 47,7-17.

[15] ГРИН К.Ю., АНДО Т., БАЛАЯН М.С., БЕРКЕ Т., КЛАРК И.Н., ЭСТЕС М.К., МЭТСОН Д.О., НАКАТА С., НИЛ Дж.Д., СТУДДЕРТ М.Дж. и ТИЛЬ Х-Дж. (2000). Таксономия калицивирусов. *Журнал «Инфекционные болезни»,* 181,(S2), S322-S330, <https://doi.org/10.1086/315591>

[16] ГИТТРЕ С., БАГИНСКИ И., ЛЕ ГАЛЛ Г., ПРАВ М., ТРЕПО О. и КОВА Л. (1995). Обнаружение изолятов вируса геморрагической болезни кроликов и сравнение последовательностей N-конца гена корового белка с помощью полимеразной цепной реакции. *Исследования в области ветеринарии,* 58, 128-132.

[17] ЛАВАЦЦА А., ТИТТАРЕЛЛИ С. и ЧЕРИОЛИ М. (2015). Использование сывороток реконвалесцента в иммуноэлектронной микроскопии для выявления не вызывающих подозрений/новых вирусных агентов. *Dbhecs,* **7,** 2683-2703. ИЦО: 10.3390/v7052683.

[18] ЛЕ ГАЛЛ-РЕКУЛЕ Г., ЛАВАЦЦА А., МАРШАНДО С., БЕРТАНЬОЛИ С., ЦВИНГЕЛЬШТЕЙН Ф., КАВАДИНИ П., МАРТИНЕЛЛИ Н., ЛОМБАРДИ Г., ГЕРЕН Ж.Л., ЛЕМЕТР Э., ДЕКОРС А., БУШЕ С., ЛЕ НОРМАНД Б. и КАПУЧЧИ Л. (2013). Появление нового лаговируса, связанного с вирусом геморрагической болезни кроликов. *Ветеринарные исследования,* 44, 81. ИЦО: 10.1186/1297-9716-44-81.

[19] ЛЕ ГАЛЛЬ-РЕКУЛЬ Г., ЦВИНГЕЛЬШТЕЙН Ф., ПОРТЕЖУА Ю. И ЛЕ ГАЛЛЬ Г. (2001). ОТ-ПЦР-анализ с захватом антигена или антитела для выявления и молекулярно-эпидемиологических исследований вирусов геморрагической болезни кроликов и синдрома европейского зайца-русака. *Журнал вирусологии. Методы,* 97**,** 49-57.

[20] ЛЕ ГАЛЛЬ-РЕКЮЛЬ Г., ЛЕМЕТР Э., БРИАН Ф-Х и МАРШАНДО С. (2015). Характеристика во Франции непатогенных лаговирусов, тесно связанных с калицивирусом австралийского кролика RCV-A1: подтверждение европейского происхождения RCV-A1 на *X Международном конгрессе ветеринарной вирусологии* «Изменяющиеся вирусы в меняющемся мире». Франция: Монпелье; 2015. стр. 183-185

[21] ЛЕ ПЕНДУ Дж., АБРАНТЕС Дж., БЕРТАНЬОЛИ С., ГИТТОН Дж.С., ЛЕ ГАЛЛ-РЕКУЛЕ Г., ЛОПЕС А.М., МАРШАНДО С., АЛЬДА Ф., АЛМЕЙДА Т., АЛВЕС П.С., БАРСЕНА Дж., БУРМАКИНА Г., БЛАНКО Э., КАЛЬВЕТЕ С., КАВАДИНИ П., КУК Б., ДАЛТОН К. П., ДЕЛИБЕС МАТЕОС М., ДЕПТУЛА У., ИДЕН Дж.-С., ФАНГ У., ФЕРРЕЙРА К.С., ФЕРРЕЙРА П., ФОРОНДА П., ГОНКАЛВЕС Д., ГАВЬЕ-ВИДЕН Д., ХОЛЛ Р., ХУКОВСКА-ШЕМАТОВИЧ Б., КЕРР П., КОВАЛИСКИ Дж., ЛАВАЦЦА А., МАХАР Дж., МАЛОГОЛОВКИН А., МАРКЕС Р., МАРКЕС С., МАРТИН-АЛОНСО А., МОНТЕРРОЗО П., МОРЕНО С., МУТЦЕ Г., НЕЙМАНИС А., НЕДЗВЕДЗКА-РИСТВЕЙ П., ПИКОК Д., ПАРРА Ф., РОККИ М., РУКО С., РУВОЕН-КЛУЭ Н., СИЛЬВА Э., СИЛЬВЕРИО Д., СТРЕМИСЬ Т., ТОМПСОН Г., ТОКАРЗ-ДЕПТУЛА Б. & ЭСТЕВЕС ПЕДРО Х. (2017). Предложение по единой системе классификации и номенклатуре лаговирусов. *Журнал общей вирусологии,* 98,1658-1666. ИЦО: 10.1099/jgv.0.000840.

[22] ЛЮ С.Дж., СЮЭ Х.П., Пу Б.К. и КУЯНЬ Н.Х. (1984). Новое вирусное заболевание кроликов. *Anim. Hus. Vet. Med.,* 16, 253-255.

[23] МАХАР Дж.Э., ХОЛЛ Р. Н., ШИ М. МОУРАНТ Р., ХУАН Н., СТРАЙВ Т. и ХОЛМС Э.С. (2019). Обнаружение трех новых лаговирусов кроликов раскрывает неизученное вирусное разнообразие этого рода. *Эволюция вируса,* 5,vez005, <https://doi.org/10.1093/ve/vez005>.

[24] МАРШАНДО С., ЛЕ ГАЛЛ-РЕКЮЛЬ Г., БЕРТАНЬОЛИ С., ОБИНО Дж., БОТТИ Г. и ЛАВАЦЦА А. (2005). Серологические доказательства наличия незащитного вируса, подобного ВГБК. *Ветеринарные исследования,* 36,53-62.

[25] НЕЙМАНИС А., ЛАРССОН ПЕТТЕРССОН У., ХУАН Н., ГАВЬЕ-УАЙДЕН Д. и СТРАЙВ Т. (2018). Объяснение патологии и распространения в тканях *Lagovirus europaeus* GI.2/ВГБК2 (вирус геморрагической болезни кроликов 2) у молодых и взрослых кроликов *(Oryctolagus cuniculus). Ветеринарные исследования,* 49,46. ИЦО: 10.1186/s13567-018-0540-z.

[26] ОЛИНГЕР Р.Ф., ХААС Б., МЕЙЕРС Г., ВЕЙЛАНД Ф. и ТИЛЬ Х.Дж. (1990). Идентификация и характеристика вируса, вызывающего геморрагическую болезнь кроликов. *Журнал вирусологии,* 64,3331 -3336.

[27] РОБИНСОН А.Дж., КИРКЛАНД П.Д., ФОРРЕСТЕР Р.И., КАПУЧЧИ Л. И КУК Б.Д. (2002). Серологические доказательства наличия калицивируса у австралийских диких кроликов, *Oryctolagus cuniculus*, до введения ВГБК: его потенциальное влияние на специфичность конкурентного ИФА для ВГБК. *Исследования дикой природы,* 29,655-662.

[28] СТОКЛ-БЕРГЕР Н., КЕЛЛЕР-БЕРГЕР Б., АККЕРМАН М. и ЭРЕНСПЕРГЕР Ф. (1992). Иммуногистологическая диагностика геморрагической болезни кроликов (ГБК). *Журнал «Ветеринарная медицина». [B],* 39, 237-245.

[29] СТРАЙВ Т., РАЙТ Дж.Д. и РОБИНСОН А.Дж. (2009). Идентификация и частичная характеристика нового лаговируса у австралийских диких кроликов. *Вирусология,* 384,97-105.

[30] ВЕЛАРДЕ Р., КАВАДИНИ П., НЕЙМАНИС А., КАБЕСОН О., КЬЯРИ М., ГАФФУРИ А., ЛАВИН С., ГРИЛЛИ Г., ГАВЬЕ-ВИДЕН Д., ЛАВАЦЦА А. и КАПУЧЧИ Л. (2017). Случаи вторичного заражения зайцев-русаков (*Lepus europaeus*) вирусом геморрагической болезни кроликов 2-го типа (ВГБК2) вызвали спорадические случаи заболевания, подобного синдрому европейского зайца-русака, в Италии и Испании. *Трансграничные и быстрораспространяющиеся заболевания,* 64,1750-1761. ИЦО:10.1111/tbed.12562

[31] ВИРБЛИЧ С., МЕЙЕРС Г., ОЛИНГЕР В.Ф., КАПУЧЧИ Л., ЭСКЕНС У., ХААС Б. и Х.-Дж. ТИЛЬ (1994). Вирус синдрома европейского зайца-русака: связь с вирусом геморрагической болезни кроликов и другими калицивирусами. *Журнал вирусологии,* 68,5164-5173.

[32] ЯН Л., ВАН Ф., ХУ Б., СЮЭ Дж., Ху Ю., ЧЖОУ Б., ВАН Д. и СЮЙ В. (2008). Разработка метода ОТ-ПЦР для выявления вируса геморрагической болезни кроликов (ВГБК) и эпидемиологии ВГБК в трех восточных провинциях Китая. *Журнал вирусологии. Методы,* 151,24-29. ИЦО: 10.1016/j.jviromet.2008.04.003.

[33] Рекомендации Всемирной организации здравоохранения животных Международного эпизоотического бюро (МЭБ) «Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных», глава 1.1.4.

Примечание - Существует референтная лаборатория МЭБ по геморрагической болезни кроликов (просим ознакомиться с веб-сайтом МЭБ: https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3 ). Пожалуйста, свяжитесь с референтными лабораториями МЭБ для получения любой дополнительной информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах против геморрагической болезни кроликов

**МКС 11.220**

**Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, геморрагическая болезнь кроликов, методы испытаний, вакцина

**МКС 11.220**

**Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, геморрагическая болезнь кроликов, методы испытаний, вакцина

РАЗРАБОТЧИК:

РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Заместитель**  **генерального директора** |  | **Е. Амирханова** |
| **Руководитель**  **Департамента разработки НТД** |  | **А. Сопбеков** |
| **Специалист**  **Департамента разработки НТД** |  | **Ж. Туяков** |