

DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-22-28  
 УДК 619:616.98:578.824.9:636.92:615.371

# Отработка режимов инактивации вируса геморрагической болезни кроликов 1-го и 2-го типов

Е. Д. Куникова<sup>1</sup>, Н. В. Мороз<sup>2</sup>, М. А. Долгова<sup>3</sup>, Л. В. Малахова<sup>4</sup>, И. А. Комаров<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,5</sup> ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия» (ФГБОУ ВО Костромская ГСХА), пос. Караваево, Костромская обл., Россия

<sup>1</sup> ORCID 0000-0003-2384-8162, e-mail: kunikova@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0002-9672-8594, e-mail: moroz@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0001-8061-1116, e-mail: dolgova@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0001-8011-5657, e-mail: van@ksaa.edu.ru

<sup>5</sup> ORCID 0000-0002-2084-4484, e-mail: komarov@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Цель настоящих исследований состояла в подборе режимов инактивации вируса геморрагической болезни кроликов 1-го (RHDV1) и 2-го (RHDV2) типов для использования полученных антигенов в составе инактивированных вакцин и диагностикумов. Изучали инактивирующее действие аминоэтилэтиленимина и  $\beta$ -пропиолактона в различных концентрациях в зависимости от времени экспозиции и температуры. Оценка инактивирующего эффекта используемого соединения соответственно принятым условиям испытания (концентрация, температура и время экспозиции) проводили на группе кроликов. Каждому животному делали внутримышечную инъекцию пробы инактивируемого материала в объеме 1 см<sup>3</sup>. По истечении максимального интервала экспозиции аналогичным образом испытывали пробу контрольного образца вирусного материала, который содержали при тех же условиях без добавления инактиванта. В опытных и контрольных группах повреждающее действие оценивали с помощью показателя летальности:  $L = m/n$ , где  $m$  – число погибших животных;  $n$  – общее количество кроликов в группе для испытания данной пробы инактивируемого материала. Посмертный диагноз подтверждали исследованием гомогената ткани печени кроликов на наличие соответствующих антигенов при помощи иммуноферментного анализа. Установили, что аминоэтилэтиленимин и  $\beta$ -пропиолактон не одинаково воздействовали на исследуемые варианты вируса. В целях максимального сохранения антигенных структур вируса считали, что оптимальными условиями инактивации будут следующие: для RHDV1 – аминоэтилэтиленимином в концентрации 0,3% при 37 °C и экспозиции 72 ч или  $\beta$ -пропиолактоном в концентрации 0,1–0,3% при 25–37 °C и экспозиции 24–48 ч; для RHDV2 – аминоэтилэтиленимином в концентрации 1,0% при 37 °C и экспозиции 72 ч или  $\beta$ -пропиолактон в концентрации 0,3% при 25 °C и экспозиции 24 ч.

**Ключевые слова:** Вирусная геморрагическая болезнь кроликов, инактивированная вакцина, аминоэтилэтиленимин,  $\beta$ -пропиолактон, инактивация вируса геморрагической болезни кроликов.

**Благодарность:** Работа выполнена за счет средств по государственному контракту № 92/19 по теме «Выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по разработке ассоциированной вакцины против миксоматоза, пастереллеза и вирусной геморрагической болезни кроликов 1 и 2 серотипов».

**Для цитирования:** Куникова Е. Д., Мороз Н. В., Долгова М. А., Малахова Л. В., Комаров И. А. Отработка режимов инактивации вируса геморрагической болезни кроликов 1-го и 2-го типов. *Ветеринария сегодня*. 2021; 1 (36): 22–28. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-22-28.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Куникова Екатерина Дмитриевна, аспирант, технолог лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: kunikova@arriah.ru.

UDC 619:616.98:578.824.9:636.92:615.371

## Optimization of RHDV type 1 and 2 inactivation modes

E. D. Kunikova<sup>1</sup>, N. V. Moroz<sup>2</sup>, M. A. Dolgova<sup>3</sup>, L. V. Malakhova<sup>4</sup>, I. A. Komarov<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,5</sup> FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

<sup>4</sup> FSBEI HE "Kostroma State Agricultural Academy" (FSBEI HE Kostroma SAA), Karavaevo, Kostroma Oblast, Russia

<sup>1</sup> ORCID 0000-0003-2384-8162, e-mail: kunikova@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0002-9672-8594, e-mail: moroz@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0001-8061-1116, e-mail: dolgova@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0001-8011-5657, e-mail: van@ksaa.edu.ru

<sup>5</sup> ORCID 0000-0002-2084-4484, e-mail: komarov@arriah.ru

**SUMMARY**

The purpose of these studies was to optimize RHDV type 1 and 2 (RHDV1 and RHDV2) inactivation modes to use the obtained antigens in inactivated vaccines and diagnosticums. The inactivating effect of aminoethylethylenimine and  $\beta$ -propiolactone was studied in different concentrations in correlation with the exposure time and temperature. The correlation between the inactivating effect of the compound used and the accepted test conditions (concentration, temperature, and exposure time) was studied on a group of rabbits, each of which was injected intramuscularly with 1 cm<sup>3</sup> of the inactivated material sample. At the end of the maximum exposure interval, a control sample of the viral material, kept under the same conditions without any inactivant added was similarly tested. Lethality was considered to evaluate the damaging action in the test and control groups:  $L = m/n$ , where  $m$  is the number of dead animals;  $n$  is the total number of rabbits in the group for testing of the inactivated material sample. The postmortem diagnosis was confirmed by testing the rabbit liver tissue homogenate for relative antigens using ELISA. It was found that aminoethylethylenimine and  $\beta$ -propiolactone did not have the same effect on the studied variants of the virus. In order to preserve at maximum the antigenic structures of the virus, the following inactivation modes were considered to be optimal: for RHDV1-aminoethylethylenimine at a concentration of 0.3% at 37 °C, exposure time – 72 hours, or  $\beta$ -propiolactone at a concentration of 0.1–0.3% at 25–37 °C, exposure time – 24–48 hours; for RHDV2 – aminoethylethylenimine at a concentration of 1% at 37 °C, exposure time – 72 hours, or  $\beta$ -propiolactone at a concentration 0.3% at 25 °C, exposure time – 24 hours.

**Keywords:** Viral hemorrhagic disease of rabbits, inactivated vaccine, aminoethylethylenimine,  $\beta$ -propiolactone, inactivation of rabbit hemorrhagic disease virus.

**Acknowledgements:** The work was carried out at the expense of funds under the state contract No. 92/19 on the topic “Research and Development of a combined vaccine against myxomatosis, pasteurellosis and viral hemorrhagic disease of rabbits, serotypes 1 and 2”.

**For citation:** Kunikova E. D., Moroz N. V., Dolgova M. A., Malakhova L. V., Komarov I. A. Optimization of RHDV type 1 and 2 inactivation modes. *Veterinary Science Today*. 2021; 1 (36): 22–28. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-22-28.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Ekaterina D. Kunikova, Post-Graduate Student, Technologist, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI “ARRIAH”, 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: kunikova@arriah.ru.

**ВВЕДЕНИЕ**

Геморрагическая болезнь кроликов (RHD) – высококонтагиозное заболевание, характеризующееся острым течением, явлениями геморрагического диатеза во всех органах и тканях и высокой летальностью (80–100%) [1]. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус, который относится к семейству *Caliciviridae*, роду *Lagovirus*, генетически связан с вирусом синдрома европейского бурого зайца [2]. Вирионы диаметром 20–40 нм имеют сферическую форму, обладают гемагглютинирующими свойствами [3, 4].

Впервые RHD была зарегистрирована в Китае в 1984 г. в провинции Цзянсу у ангорских кроликов, завезенных из ФРГ. Затем заболевание получило распространение в странах Европы и Азии [5]. По данным Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ), на 2020 г. неблагополучными по RHD признаны Дания, Бенин, Исландия, Канада, США, Мексика, Финляндия.

Считается, что в природе неопределенно долгое время циркулировали слабовирулентные варианты вируса RHD. Однако в последние десятилетия произошли существенные эволюционные изменения возбудителя, которые выразились в значительном увеличении его вирулентности [3].

В 2010 г. во Франции был выделен вирус RHD типа 2 (RHDV2). Средняя гомология участка генома, кодирующего основной капсидный белок VP60, нового варианта вируса и известных штаммов данного возбудителя (RHDV1) составила 87%. При этом, что наиболее важно, вакцины на основе RHDV1 не были эффективны [6].

В России к 2018 г. было зарегистрировано несколько случаев болезни, обусловленных RHDV2 [7]. Характерным признаком, отличающим новый тип вируса от RHDV1, является способность поражать молодняк кроликов, не достигший 2-недельного возраста [8].

На сегодняшний день на рынке ветеринарных препаратов в Российской Федерации представлены вакцины против RHD, изготовленные из штаммов, относящихся к типу 1 [9]. Это определило цель настоящих исследований, а именно – подбор режимов инаktivации вируса геморрагической болезни кроликов 1-го и 2-го типов для использования полученных антигенов в составе инаktivированных вакцин и диагностикумов.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Штаммы.** В исследования были включены следующие штаммы вируса: RHDV1 – ВГБК1/ВНИИЗЖ (инфекционный титр  $3,00 \pm 0,25 \text{ lg ЛД}_{50}/\text{см}^3$ ); RHDV2 – ВГБК2/ВНИИЗЖ (инфекционный титр  $4,00 \pm 0,25 \text{ lg ЛД}_{50}/\text{см}^3$ ).

**Вирусосодержащий материал.** Для исследований использовали 10%-ю тканевую суспензию (вес/объем), полученную из ткани печени кроликов, инфицированных RHDV1 и RHDV2. Гомогенат готовили на физиологическом растворе (0,9%-й раствор NaCl). Диспергирование выполняли на лабораторном измельчителе тканей при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Тканевой гомогенат хранили в холодильнике при минус 20 °C. Перед использованием в эксперименте в размороженный материал вносили хлороформ (2% по объему) и высокомолекулярный полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (0,1% по объему), активно перемешивали и центрифугировали при 500 g в течение 20 мин. Для дальнейшей работы использовали надосадочную жидкость.

**Реакция гемагглютинации.** Определение гемагглютинирующей активности вируса проводили в соответствии с методикой, изложенной в Руководстве МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных [1]. Гемагглютинирующая активность приготовленного вирусосодержащего материала составляла не менее 1:1280–1:2560 ГАЕ.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Наличие антигена вируса RHD определяли с использованием набора INgezim RHDV DAS (Ingenasa, Испания) в соответствии с прилагаемой инструкцией [10].

**Животные.** Для проведения исследований использовали 360 невакцинированных против ВГБК кроликов породы советская шиншилла (в возрасте 45 суток, живой массой 1,0–1,5 кг) из хозяйств, благополучных по инфекционным болезням. Животных содержали группами в изоляторах с автономными системами поения и кормления.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33216-2014 и ГОСТ 33215-2014, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Для эвтаназии кроликов использовали пары трихлорметана.

**Инактиванты.** Для инаktivации вирусосодержащих материалов использовали аминоэтилэтиленмин в виде 15%-го водного раствора (АЭЭИ, ООО НПП «Биохимсервис», Россия) и  $\beta$ -пропиолактон (Acros Organics, США).

**Инаktivация.**  $\beta$ -пропиолактон перед использованием разбавляли фосфатно-буферным раствором до концентрации 10%. Предварительно рН рабочего раствора АЭЭИ с помощью уксусной кислоты доводили до 8,2–8,3. Подготовленные инаktivанты добавляли в вирусосодержащий материал до заданных конечных концентраций. Процедуру инаktivации проводили при 25 и 37 °С. Через заданные интервалы времени производили отбор проб для определения полноты инаktivации вируса. При тех же условиях содержали образец вирусосодержащего материала без добавления инаktivанта (контроль). Пробы контрольного образца отбирали по истечении наибольшего интервала экспозиции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценку различий инаktivированного эффекта исследуемых соединений в зависимости от концентрации, температуры и времени экспозиции проводили на 360 кроликах. Каждая опытная группа состояла из трех животных, каждому из которых делали внутримышечную инъекцию пробы инаktivированного материала в объеме 1 см<sup>3</sup>. По истечении наибольшего интервала экспозиции аналогичным образом испытывали пробу контрольного образца.

В течение 10 суток за подопытными животными вели клинические наблюдения. Регистрировали летальность, специфичность которой подтверждали по следующим признакам: наличие кровянистых или серозных пенистых экссудатов вокруг носа; увеличение печени, дистрофические изменения в ней; мраморность легких; дряблость почек, их цвет (от светло- до темно-красного), наличие на капсуле точечных или полосчатых кровоизлияний с нечетко выраженными краями; гиперемия и геморрагии в кишечнике, наиболее выраженные на вершинах складок [11].

В опытных и контрольных группах повреждающее действие оценивали по показателю летальности

$L = m/n$ , где  $m$  – число погибших животных;  $n$  – общее количество кроликов в группе, сформированной для испытания данной пробы инаktivированного материала.

Посмертный диагноз дополнительно подтверждали исследованием гомогената печени кроликов на наличие антигена RHDV при помощи ИФА. Полноту инаktivации исследуемых материалов подтверждали по отсутствию антигена RHDV в органах выживших кроликов через 10 суток после введения тестируемых образцов инаktivированного материала.

Полученные результаты оценки инаktivированного эффекта используемых соединений представлены в таблице.

В результате проведенного исследования установили, что:

- штамм RHDV1 оказался высокочувствителен к  $\beta$ -пропиолактону. Образцы, полученные после воздействия всех испытанных концентраций инаktivанта при всех условиях экспозиции, не содержали инфекционный вирус ( $L = 0$ );

- штамм RHDV1 показал определенную чувствительность к АЭЭИ. Полную инаktivацию возбудителя наблюдали при всех температурных режимах только после воздействия концентраций свыше 0,2%;

- штамм RHDV2 продемонстрировал определенную чувствительность ко всем испытанным концентрациям  $\beta$ -пропиолактона. Однако для полной инаktivации возбудителя при 25 °С требовались концентрация не менее 0,3% и экспозиция не менее 24 ч. При 37 °С, независимо от времени экспозиции, все испытанные концентрации обеспечивали полную инаktivацию возбудителя.

- штамм RHDV2 показал относительно высокую устойчивость к воздействию АЭЭИ. При 25 °С и концентрациях инаktivанта до 1,0% возбудитель полностью сохранял биологическую активность практически на всех временных интервалах. Исключение составил интервал в 72 ч, где показатель летальности при концентрации 0,45% имел значение  $L = 2/3$ . Полную инаktivацию вируса при 25 °С наблюдали после воздействия 1,0%-го инаktivанта в течение 72 ч. При 37 °С полная инаktivация вируса происходила при концентрации АЭЭИ 1,0%, независимо от времени экспозиции.

Следует отметить, что все контрольные образцы вирусосодержащих материалов обоих штаммов при всех испытанных условиях экспозиции сохраняли биологическую активность. Это исключает возможность спонтанной инаktivации вируса в процессе эксперимента.

Результаты исследований гомогената ткани печени, полученной от погибших кроликов экспериментальных и контрольных групп, показали наличие антигена RHDV, что подтвердило специфическую гибель животных. Анализ гомогената ткани печени выживших кроликов доказал полную инаktivацию вируса.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Возникновение нового варианта вируса, имеющего существенные антигенные отличия, всегда является значимым событием для данной экологической ниши. Этот феномен наглядно демонстрирует эпизоотическая ситуация в Австралии, где в мае 2015 г. был обнаружен RHDV2. Ретроспективные исследования показали, что вирусы данного семейства имеют скорость генетической эволюции  $(2,8–5,4) \times 10^{-3}$  замены в год, которые происходят равномерно как в неструктурных,

## Таблица

Оценка полноты инактивации RHDV1 и RHDV2 соответственно концентрациям химических соединений, температуре и времени экспозиции

## Table

Correlation between RHDV1 and RHDV2 inactivation completeness and the tested concentrations, temperature, and exposure time

Летальность кроликов после инъекции вирусной суспензии с добавлением β-пропиолактона							
тип вируса	D, %	25 °C			37 °C		
		24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
RHDV1	0,10	0/3*	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	0,20	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	0,30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	контроль**	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
RHDV2	0,10	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	0,20	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	0,30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	контроль	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Летальность кроликов после инъекции вирусной суспензии с добавлением АЭЭИ							
тип вируса	D, %	25 °C			37 °C		
		24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
RHDV1	0,10	3/3	2/3	1/3	3/3	2/3	1/3
	0,20	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
	0,30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	0,45	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	1,00	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	контроль	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
RHDV2	0,10	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	0,20	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	0,30	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3
	0,45	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	1/3
	1,00	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	контроль	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

\* Отношение погибших животных к общему количеству в группе;

\*\* суспензия без добавления инактиванта; D – концентрация инактиванта (%).

Цветом выделены условия, при которых летальный эффект отсутствовал.

\* Ratio of dead animals to the total number of animals in the group;

\*\*suspension without inactivant; D – inactivant concentration (%).

Conditions under which no lethal effect were observed are highlighted in color.

так и в структурных белок-кодирующих областях генома. Однако у RHDV2 изменения области, кодирующей VP60 (внешний антиген вируса), наблюдались с непропорционально высокой частотой. Было сделано предположение, что такого рода эволюционный процесс продолжается [12].

Считается, что в настоящее время, в связи с иммунологическими особенностями, RHDV2 имеет большой эпизоотический потенциал, что подтверждается данными о вытеснении штаммов RHDV1, которые ранее циркулировали в полевых условиях во Франции, Испании и Португалии [13].

Следует отметить, что RHDV2 не демонстрирует явных преимуществ по активности воспроизводства

в макроорганизме. Накопление геномных копий этого типа возбудителя на 1 мг ткани печени кролика составляло  $3 \times 10^8$ , при этом RHDV1 репродуцировался до концентрации  $2 \times 10^8$  геномных копий на миллиграмм ткани [12]. Данное обстоятельство ставит под сомнение утверждение, что показатель интенсивности репродукции вируса RHD типа 2 является признаком его вирулентности.

В рамках поставленной цели исследований определены условия, при которых β-пропиолактон и АЭЭИ полностью инактивируют вирус геморрагической болезни кроликов типов 1 и 2, что позволит получить антигены, которые могут быть использованы для приготовления инактивированной вакцины.

Выбор метода инактивации вируса, т. е. способа устранения его инфекционной способности, может в полной мере определить иммунологические свойства вакцины. Главными критериями эффективности избранного метода являются полнота и необратимость инактивации вируса, а также сохранение его первоначальных антигенных свойств.

Из химических соединений наиболее часто используют два типа инактиваторов: ретикулирующие (разрыхляющие) и алкилирующие. К агентам, ретикулирующим белки, относятся альдегиды (формальдегид, глутаральдегид и глицидальдегид). К алкилирующим агентам, которые воздействуют на структуру нуклеиновых кислот, относятся  $\beta$ -пропиолактон, этиленмин и др. [14].

При оптимальных условиях  $\beta$ -пропиолактон инактивирует, например, вирус ньюкаслской болезни без существенного изменения гемагглютинирующей, нейраминидазной и гемолизирующей активности. Это также относится и к вирусу инфекционного бронхита кур, который после воздействия указанного соединения удовлетворительно сохраняет антигенные свойства. Однако повышение концентрации  $\beta$ -пропиолактона может привести к нежелательной реакции с вирусными белками и, как следствие, – к снижению антигенной активности [14].

Соединения, взаимодействующие с вирусным геномом, называются генотоксическими. В водных растворах такие инактиваторы распадаются с образованием высокоактивных производных, содержащих избыточный положительный заряд – так называемую электрофильную группу (например, хлорэтиламин). Электрофильная группа взаимодействует с отрицательно заряженными (нуклеофильными) группами молекул ДНК или РНК, образуя стабильную ковалентную связь. При репликации такой нуклеотид, связанный с молекулами инактиватора, может быть не считан или неправильно считан полимеразой, что исключает его репликацию или приводит к летальным мутациям [15]. Важным обстоятельством является то, что азотсодержащие гетероциклические соединения инактивируют вирусы в реакции первого порядка, при этом скорость инактивации и конечная точка с достаточной точностью могут быть определены. Это позволяет объективно оценить безопасность конечного продукта [16].

Этиленмин и его N-ацетильное производное инактивируют широкий спектр вирусов, принадлежащих к нескольким различным семействам, в условиях, которые не нарушают ферментативные или серологические свойства ряда белков [17]. Результаты специальных исследований свойств вируса ящура различных типов, инактивированного производными этилена, свидетельствовали, что препараты азиридинового ряда минимально изменяли ответственные за антигенность белковые структуры вириона [18]. Изучение структуры антигена вируса ящура после инактивации этиленмином показало высокий процент 140S-компонента, соответствующего вирионам с сохраненной архитектурой капсида [19]. При инактивации вируса инфекционного ларинготрахеита птиц формалином,  $\beta$ -пропиолактоном, метиленимином и этиленмином установлено, что антиген, полученный после воздействия этиленмина, оказался наиболее иммуногенным [20].

Эффективность воздействия инактиватора зависит по крайней мере от трех факторов: заданной концен-

трации, температуры и времени экспозиции. По результатам ПЦР было установлено, что концентрация бинарного этиленмина 0,001 М не влияла на ген гликопротеида вируса гриппа птиц в течение 8 ч экспозиции, тогда как концентрация 0,01 М уже через 4 ч изменяла структуру данного гена [21]. На примере вируса ящура показано, что при повышении температуры от 25 до 37 °С ацетилэтиленмин в концентрации 0,01% ускорял процесс инактивации более чем на порядок [22]. Если при обработке суспензии вируса ящура 0,05%-м ацетилэтиленмином при 37 °С в течение 8 ч инфекционность возбудителя еще сохранялась, то при увеличении времени экспозиции до 12 ч вирус был инактивирован полностью [23].

Одним из важных преимуществ таких инактиваторов, как  $\beta$ -пропиолактон и этиленмин, является то, что они полностью гидролизуются в течение нескольких часов с образованием нетоксичных продуктов, в связи с чем отпадает необходимость их нейтрализации [14].

Известно, что для инактивации вируса геморрагической болезни кроликов могут быть использованы формальдегид, теотропин (А-24) [24, 25]. В некоторых инструкциях по применению инактивированных вакцин против данного заболевания в качестве инактиватора указан формалин [26, 27].

В Российской Федерации на рынке ветеринарных препаратов для специфической профилактики геморрагической болезни кроликов представлено несколько инактивированных вакцин: «Вакцина против вирусной геморрагической болезни кроликов тканевая инактивированная гидроокисью алюминия» (ФГБНУ ФИЦВиМ, Россия) [26]; «Лепимун Гем-2» (BioTestLab, Украина) [27]; Pestorin (Bioveta, Чешская Республика) [28]; «Раббивак-V» (ООО «ТД «Биагро», Россия) [29]. Кроме этого, в 2018 г. была зарегистрирована векторная вакцина «Нобивак Мухо-RHD» (Intervet International B.V., Нидерланды), содержащая рекомбинантный вирус миксоматоза, в ДНК которого встроены гены, кодирующие капсидные протеины вируса геморрагической болезни [30].

Однако только в составе препарата «Лепимун Гем-2» официально указано присутствие антигенов RHDV1 и RHDV2.

Поскольку уровень перекрестной защиты при иммунизации моновакцинами на основе RHDV1 и RHDV2 является недостаточным, и правильным решением данной проблемы может быть только комбинированная вакцинация с использованием обоих антигенных типов [1], считали целесообразным провести разработку способов получения данных антигенов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные при оценке инактивирующего эффекта используемых в исследовании соединений результаты показали, что АЭЭИ и  $\beta$ -пропиолактон не одинаково воздействовали на вирус геморрагической болезни кроликов 1-го и 2-го типов. RHDV1 обладал значительно большей чувствительностью к воздействию использованных инактиваторов. В целях максимального сохранения антигенных структур вируса считали, что оптимальными условиями его инактивации будут следующие:

– для RHDV1 – АЭЭИ в концентрации 0,3% при 37 °С и экспозиции 72 ч или  $\beta$ -пропиолактон в концентрации 0,1–0,3% при 25–37 °С и экспозиции 24–48 ч;

– для RHDV2 – АЭЭИ в концентрации 1% при 37 °С и экспозиции 72 ч или β-пропиолактон в концентрации 0,3% при 25 °С и экспозиции 24 ч.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1, 2, 6, 8, 12, 13, 16–23 см. REFERENCES)

- Макаров В. В., Вишняков И. Ф., Власов Н. А., Малахова М. С. Вирус геморрагической болезни кроликов: физические и структурные характеристики. *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 1992; 4: 49–52. eLIBRARY ID: 21484449.
- Власов Н. А. Физико-химические свойства и антигенная структура вируса геморрагической болезни кроликов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Покров; 1998. 46 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000254860#?page=1>.
- Шевченко А. А., Шевченко Л. В., Зеркалев Д. Ю., Шевкопляс В. Н., Черных О. Ю. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов. *Ветеринария Кубани*. 2011; 2: 3–6. Режим доступа: [http://vetkuban.com/num2\\_20111.html](http://vetkuban.com/num2_20111.html).
- Третий случай обнаружения вируса геморрагической болезни кроликов нового типа – ВГБК-2 в Российской Федерации. *Новости ФГБНУ ФИЦВиМ*. Режим доступа: <https://fivim.ru/2019/02/tretij-sluchaj-obnaruzheniya-virusa-gemorragicheskoy-bolezni-krolikov-novogo-tipa-vgbk-2-v-rossijskoj-federacii/> (дата обращения: 09.10.2020).
- Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения. *Россельхознадзор. Компонент «Ирена»*. Режим доступа: <https://galen.vetrfr.ru/#/registry/pharm/registry?page=1> (дата обращения: 09.10.2020).
- INgezim RHDV DAS. Иммуноферментный анализ для выявления вируса геморрагической болезни кроликов в биологических образцах (Ingenasa, Испания). Режим доступа: [http://vetprofilab.ru/f/rus\\_17rhdk2.pdf](http://vetprofilab.ru/f/rus_17rhdk2.pdf).
- Музалевская А. В. Патоморфология вирусной геморрагической болезни кроликов: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Саратов; 2008. 21 с. Режим доступа: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003457192#?page=1>.
- Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика; 2007. 524 с.
- Фармакологическая группа – алкилирующие средства. Регистр лекарственных средств России (РЛС). Режим доступа: [https://www.rlsnet.ru/fg\\_index\\_id\\_268.htm](https://www.rlsnet.ru/fg_index_id_268.htm) (дата обращения: 09.10.2020).
- Шевченко А. А., Вишняков И. Ф., Дымин М. А., Зубаиров М. М., Карпов Г. М., Неверовский А. И. и др. Способ изготовления инактивированной вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов. Патент № 2039570 Российская Федерация, МПК А61К39/125 (05.1992). ВНИИВВиМ. № 5043431/13. Заявл. 26.05.1992. Оpubл. 20.07.1995.
- Шевченко А. А., Шевченко Л. В., Гнездилов И. Д., Голенский А. Г., Кружков Н. Н., Зеркалев Д. Ю. Вакцина против вирусной геморрагической болезни кроликов. Патент № 2229895 Российская Федерация, МПК А61К39/125 (11.2002). Кубанский государственный аграрный университет. № 2002130881/13. Заявл. 18.11.2002. Оpubл. 10.06.2004.
- Инструкция по ветеринарному применению вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов тканевой инактивированной гидроокисьалюминиевой. ФГБНУ ФИЦВиМ; 2019. Режим доступа: <https://fivim.ru/wp-content/uploads/2019/03/%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80-%D0%92%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BD%D0%B0-%D0%92%D0%93%D0%91%D0%9A-%D0%B6%D0%B8%D0%B4%D0%BA%D0%B0%D1%8F-17.01.19.pdf> (дата обращения: 09.10.2020).
- Вакцина против геморрагической болезни кроликов, инактивированная («Лалимун Гем-2», BioTestLab). Режим доступа: <https://www.biotestlab.ua/products/lapimun-gem-2/> (дата обращения: 09.10.2020).
- Вакцина против геморрагической болезни кроликов (Pestorin, Bioveta). Режим доступа: <https://www.bioveta.cz/ru/preparaty/zdorove-zhivotnyh/pestorin.html> (дата обращения: 09.10.2020).
- Вакцина против вирусной геморрагической болезни кроликов («Раббивак-V») (ООО «ТД «Биагро»). *VetLek. Ветеринарная интернет-аптека*. Режим доступа: <https://www.vetlek.ru/directions/?id=787> (дата обращения: 09.10.2020).
- Вакцина против миксоматоза и вирусной геморрагической болезни кроликов, живая сухая с растворителем («Нобивак Мухо-RHD», Intervet International B.V.). Режим доступа: <https://www.msd-animal-health.ru/product/nobivacmuho-rhd> (дата обращения: 09.10.2020).

## REFERENCES

- Rabbit haemorrhagic disease. In: *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2018; Chap. 3.6.2: 1389–1406. Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.06.02\\_RHD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.02_RHD.pdf) (date of access: 09.10.2020).

- Moss S. R., Turner S. L., Trout R. C., White P. J., Hudson P. J., De-sai A., et al. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* 2002; 83 (Pt 10): 2461–2467. DOI: 10.1099/0022-1317-83-10-2461. PMID: 12237428.
- Makarov V. V., Vishnyakov I. F., Vlasov N. A., Malakhova M. S. Rabbit hemorrhagic disease virus: physical and structural characteristics. [Virus gemorragicheskoy bolezni krolikov: fizicheskie i strukturnye harakteristiki]. *Vestnik of the Russian Agricultural Sciences*. 1992; 4: 49–52. eLIBRARY ID: 21484449. (in Russian)
- Vlasov N. A. Physico-chemical properties and antigenic structure of rabbit hemorrhagic disease virus [Fiziko-himicheskie svoystva i antigen-naya struktura virusa gemorragicheskoy bolezni krolikov]: Author's abstract of Doctor's thesis (Biological Sciences). Pskov; 1998. 46 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000254860#?page=1>. (in Russian)
- Shevchenko A. A., Shevchenko L. V., Zerkalev D. Yu., Shevkoplyas V. N., Chernykh O. Yu. Viral haemorrhagic disease of rabbits. *Veterinaria Kubani*. 2011; 2: 3–6. Available at: [http://vetkuban.com/num2\\_20111.html](http://vetkuban.com/num2_20111.html). (in Russian)
- Le Gall-Reculé G., Zwingelstein F., Boucher S., Le Normand B., Plassi-art G., Portejoie Y., et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec*. 2011; 168 (5): 137–138. DOI: 10.1136/vr.d697. PMID: 21493491.
- The third case of a new type of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV-2) detection in the Russian Federation. [Tretij sluchaj obnaruzheniya virusa gemorragicheskoy bolezni krolikov novogo tipa – VGBK-2 v Rossijskoj Federacii]. *News FRCVM*. Available at: <https://fivim.ru/2019/02/tretij-sluchaj-obnaruzheniya-virusa-gemorragicheskoy-bolezni-krolikov-novogo-tipa-vgbk-2-v-rossijskoj-federacii/> (date of access: 09.10.2020). (in Russian)
- FAQ. Hämmorrhagische Krankheit der Kaninchen (RHDV, RHDV-2). *Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit*. Stand: 02.05.2017. Available at: [https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar\\_derivate\\_00002514/FLI-Information-FAQ-RHDV-2017-05-02.pdf](https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00002514/FLI-Information-FAQ-RHDV-2017-05-02.pdf) (date of access: 07.10.2020). (in German)
- State Register of medicines for veterinary use. [Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv dlya veterinarnogo primeneniya]. *Rossel-khozndzor. Component "Irena"*. Available at: <https://galen.vetrfr.ru/#/registry/pharm/registry?page=1> (date of access: 09.10.2020). (in Russian)
- INgezim RHDV DAS. ELISA for the detection of RHDV in biological samples [Immuofermentnyj analiz dlya vyyavleniya virusa gemorragicheskoy bolezni krolikov v biologicheskix obrazцах] (Ingenasa, Spain). Available at: [http://vetprofilab.ru/f/rus\\_17rhdk2.pdf](http://vetprofilab.ru/f/rus_17rhdk2.pdf). (in Russian)
- Muzaljevskaya A. V. Pathomorphology of viral haemorrhagic rabbit disease [Patomorfologiya virusnoj gemorragicheskoy bolezni krolikov]: Author's abstract of Candidate's thesis (Veterinary Sciences). Saratov; 2008. 21 p. Available at: <https://dlib.rsl.ru/viewer/01003457192#?page=1>. (in Russian)
- Mahar J. E., Hall R. N., Peacock D., Kovališki J., Piper M., Mourant R., et al. Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2; Gl.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival. *J. Virol.* 2018; 92 (2):e01374–17. DOI: 10.1128/JVI.01374-17.
- Peacock D., Kovališki J., Sinclair R., Mutze G., Iannella A., Capucci L. RHDV2 overcoming RHDV immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Australia. *Vet. Rec*. 2017; 180 (11): 280. DOI: 10.1136/vr.104135.
- Sergeev V. A., Nepoklonov E. A., Aliper T. I. Viruses and virus vaccines. [Virusy i virusnye vakciny]. Moscow: Biblionika; 2007. 524 p. (in Russian)
- Pharmacological group - alkylating agents. Russian Register of Medicinal Products (RLS) [Farmakologicheskaya grupa – alkiliryushchie sredstva. Registr lekarstvennyh sredstv Rossii (RLS)]. Available at: [https://www.rlsnet.ru/fg\\_index\\_id\\_268.htm](https://www.rlsnet.ru/fg_index_id_268.htm) (date of access: 09.10.2020). (in Russian)
- Bahnemann H. G. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*. 1990; 8 (4): 299–303. DOI: 10.1016/0264-410x(90)90083-x.
- Brown F. Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine*. 2001; 20 (3–4): 322–327. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00342-5.
- Bahnemann H. G. The inactivation of foot-and-mouth disease virus by ethylenimine and propylenimine. *Zentralbl. Veterinärmed. B*. 1973; 20 (5): 356–360. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1973.tb01136.x.
- Rweyemamu M. M., Unehara O., Giorgi W., Medeiros R., Lucca D., Baltazar M. Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) on the integrity of foot and mouth disease virus capsid. *Rev. Sci. Tech.* 1989; 8 (3): 747–764. DOI: 10.20506/rst.8.3.425. PMID: 32344961.
- Barhoom S., Forgacs A., Solyom F. Development of an inactivated vaccine against infectious laryngotracheitis (ILT) – serological and protection studies. *Avian Pathol.* 1986; 15 (2): 213–221. DOI: 10.1080/03079458.608436282.
- Sarachai C., Sasipreeyajan J., Chansiripornchai N. Avian influenza virus (H5N1) inactivation by binary ethylenimine. *Thai J. Vet. Med.*

2010; 40 (1): 41–46. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/233231064\\_Avian\\_Influenza\\_Virus\\_H5N1\\_Inactivation\\_by\\_Binary\\_Ethylenimine](https://www.researchgate.net/publication/233231064_Avian_Influenza_Virus_H5N1_Inactivation_by_Binary_Ethylenimine).

22. Cunliffe H. R. Inactivation of foot-and-mouth disease virus with ethylenimine. *Appl. Microbiol.* 1973; 26 (5): 747–750. PMID: 4357652; PMID: PMC379895.

23. Graves J. H., Arlinghaus R. B. Acetyleneimine in the preparation of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. In: *Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association.* 1967; 71: 396–403. PMID: 5257323.

24. Shevchenko A. A., Vishnjakov I. F., Dymin M. A., Zubairov M. M., Karpov G. M., Neverovskij A. I., et al. Process for manufacturing inactivated vaccine used against viral hemorrhagic diseases of rabbits. Patent No. 2039570 Russian Federation, Int. Cl. A61K39/125 (05.1992). Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut veterinarnoj virusologii i mikrobiologii. No. 5043431/13. Application: 26.05.1992. Date of publication: 20.07.1995. (in Russian)

25. Shevchenko A. A., Shevchenko L. V., Gnezdilov I. D., Golenskij A. G., Kruzhnov N. N., Zerkalev D. Ju. Vaccine against viral hemorrhagic disease in rabbits. Patent No. 2229895 Russian Federation, Int. Cl. A61K39/125 (11.2002). Kubanskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet. No. 2002130881/13. Application: 18.11.2002. Date of publication: 10.06.2004. (in Russian)

26. Instructions for veterinary use of tissue inactivated hydroxyaluminium vaccine against viral haemorrhagic rabbit disease. [Instrukciya po veterinarnomu primeneniyu vakciny protiv virusnoj gemorragicheskoy

bolezni krolikov tkanevoj inaktivirovannoj gidrookis'alyuminievoj]. FRCVM; 2019. Available at: <https://ficvim.ru/wp-content/uploads/2019/03/%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80-%D0%92%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BD%D0%B0-%D0%92%D0%93%D0%91%D0%9A-%D0%B6%D0%B8%D0%B4%D0%BA%D0%B0-%D1%8F-17.01.19.pdf> (date of access: 09.10.2020). (in Russian)

27. Inactivated vaccine against rabbit hemorrhagic disease ("Lapimun Gem-2"; BioTestLab). Available at: <https://www.biotechlab.ua/products/lapimun-gem-2/> (date of access: 09.10.2020). (in Russian)

28. Vaccine against rabbit haemorrhagic disease ("Pestorin"; Bioveta). Available at: <https://www.bioveta.cz/ru/preparaty/zdorove-zhivotny-heu/en/products/veterinary-products/pestorin-suspension-for-injection-for-rabbit.html> (date of access: 09.10.2020). (in Russian)

29. Vaccine against viral hemorrhagic rabbit disease ("Rabbivak-V" (LLC "TD "Biagro"). *VetLek. Online veterinary pharmacy.* Available at: <https://www.vetlek.ru/directions/?id=787> (date of access: 09.10.2020). (in Russian)

30. Live dry vaccine against myxomatosis and viral hemorrhagic rabbit disease with solvent ("Nobivac® Myxo-RHD"; Intervet International B.V.). Available at: <https://www.msd-animal-health.ru/product/nobivacmuho-rhd/> (date of access: 09.10.2020). (in Russian)

Поступила 02.11.2020

Принята в печать 30.11.2020

Received on 02.11.2020

Approved for publication on 30.11.2020

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Куникова Екатерина Дмитриевна**, аспирант, технолог лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Мороз Наталья Владимировна**, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Долгова Мария Алексеевна**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Малахова Людмила Васильевна**, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры эпизоотологии, паразитологии и микробиологии ФГБОУ ВО Костромская ГСХА, пос. Каравеево, Костромская обл., Россия.

**Комаров Илья Александрович**, младший научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Ekaterina D. Kunikova**, Post-Graduate Student, Technologist, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Natalia V. Moroz**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Maria A. Dolgova**, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Lyudmila V. Malakhova**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Department of Epizootology, Parasitology and Microbiology, FSBEI HE Kostroma SAA, Karavaevo, Kostroma Oblast, Russia.

**Ilya A. Komarov**, Junior Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.