



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (Caliciviridae: *Lagovirus*) геногрупп G11, G12

Мухин А.Н.¹, Алексеев К.П.¹, Южаков А.Г.², Селезнева Е.В.¹, Москвина А.С.³,
Верховский О.А.³, Алипер Т.И.¹

¹ООО «Ветбиохим», 105120, г. Москва, Россия;

²ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия;

³АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия

Введение. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ГБК) – остро протекающее высококонтагиозное заболевание, возбудителями которого являются патогенные лаговирuсы геногрупп G11 и G12. Антитела к главному капсидному белку (Vp60) вируса ГБК являются протективными.

Цель работы – оценка антигенной и иммуногенной активности вирусоподобных частиц (ВпЧ) на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК геногрупп G11 и G12 (recVP60-G11 и recVP60-G12).

Материалы и методы. Полученные в бакуловирусной системе экспрессии recVP60-G11 и recVP60-G12 исследовали методом электронной микроскопии и вводили клинически здоровым кроликам в возрасте 1,5–3 месяца в дозе 50 мкг. На 21-й день после иммунизации кроликов заражали вирулентными штаммами вируса ГБК «Воронежский-87» и «Тула» в дозе 10^3 ЛД₅₀, а сыворотки крови исследовали в ИФА на наличие антител к вирусу ГБК.

Результаты. В культуре клеток Hi-5 получены recVP60-G11 и recVP60-G12, обладающие гемагглютинирующей активностью и формирующие ВпЧ размером 30–40 нм. На 21-е сутки после введения ВпЧ у кроликов выявляли специфические антитела к вирусу ГБК с титром 1 : 200–1 : 800. Иммуногенная активность ВпЧ recVP60-G11 составила 90 и 40%, а ВпЧ recVP60-G12 – 30 и 100% после контрольного заражения вирусом ГБК 1-го и 2-го генотипа соответственно при 100% иммуногенности их смеси.

Обсуждение. ВпЧ из recVP60-G11 и recVP60-G12 обладают гемагглютинирующей, антигенной и иммуногенной активностью, что свидетельствует о возможности их использования в качестве компонентов препаратов для специфической профилактики ВГБК у кроликов. Результаты контрольного заражения показали необходимость наличия в составе вакцины антигена обоих генотипов вируса ГБК.

Заключение. RecVP60-G11 и recVP60-G12 образуют ВпЧ, обладающие гемагглютинирующей и антигенной активностью, и защищают животных при контрольном заражении вирулентными штаммами вируса ГБК генотипов G11 и G12 на уровне 90–100%.

Ключевые слова: ВГБК; VP60; вирусоподобные частицы; рекомбинантные белки; иммунный ответ; иммуногенность; защита

Для цитирования: Мухин А.Н., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Селезнева Е.В., Москвина А.С., Верховский О.А., Алипер Т.И. Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (Caliciviridae: *Lagovirus*) геногрупп G11, G12. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 132-141. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164> EDN: <https://elibrary.ru/wnrjpp>

Для корреспонденции: Мухин Алексей Николаевич, канд. биол. наук, главный научный сотрудник ООО «Ветбиохим», 109316, г. Москва, Россия. E-mail: amuhin@yahoo.com

Участие авторов: Все авторы внесли существенный вклад в проведение экспериментов, поисково-аналитическую работу и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом ООО «Ветбиохим» (протокол № 1 от 13.11.2020).

Поступила 06.02.2023

Принята в печать 04.04.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164>

Antigenic and immunogenic activity of virus-like particles based on rabbit hemorrhagic disease virus (Caliciviridae: *Lagovirus*) genotypes GI1 and GI2 recombinant major capsid proteins

Alexey N. Mukhin¹, Konstantin P. Alekseev¹, Anton G. Yuzhakov², Ekaterina V. Selezneva¹, Anna S. Moskvina³, Oleg A. Verkhovsky³, Taras I. Aliper¹

¹Vetbiochem LLC, 109316, Moscow, Russia;

²Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia;

³Research Institute for Diagnosis and Prevention of Human and Animal Diseases, 123098, Moscow, Russia

Introduction. Rabbit hemorrhagic disease is an acute highly contagious infection associated with two genotypes of pathogenic *Lagovirus*. Antibodies to major capsid protein (Vp60) are protective.

The aim of the work – is an evaluation of antigenic and immunogenic activity of virus-like particles (VLPs) based on recombinant major capsid proteins of both genotypes of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) (recVP60-GI1 and recVP60-GI2).

Materials and methods. Baculovirus-expressed VLPs were evaluated using electron microscopy and administered to clinically healthy 1.5–3 month old rabbits in a dose of 50 µg. Rabbits were challenged with 10³ LD₅₀ of virulent strains “Voronezhsky-87” and “Tula” 21 days post immunization. Serum samples were tested for the presence of RHDV-specific antibodies.

Results. VLPs with hemagglutination activity forming VLP 30–40 nm in size were obtained in Hi-5 cell culture. Specific antibody titers in rabbits measured by ELISA were 1 : 200 to 1 : 800 on 21st day post immunization with VLPs. Immunogenic activity of recVP60-GI1 VLPs was 90 and 40%, while it was 30 and 100% for recVP60-GI2 VLPs after the challenge with RHDV genotypes 1 and 2 respectively. The immunogenicity of two VLPs in mixture reached 100%.

Discussion. VLPs possess hemagglutinating, antigenic and immunogenic activity, suggesting their use as components in substances designed for RHDV specific prophylaxis in rabbits. Results of the control challenge experiment demonstrated the need to include the antigens from both RHDV genotypes in the vaccine.

Conclusion. Recombinant proteins recVP60-GI1 and recVP60-GI2 form VLPs that possess hemagglutinating an antigenic activity, and provide 90–100% level of protection for animals challenged with RHDV GI1 and GI2 virulent strains.

Keywords: RHDV; VP60; virus-like particles; recombinant proteins; immune response; immunogenicity; protection

For citation: Mukhin A.N., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Selezneva E.V., Moskvina A.S., Verkhovsky O.A., Aliper T.I. Antigenic and immunogenic activity of virus-like particles based on rabbit hemorrhagic disease virus (Caliciviridae: *Lagovirus*) genotypes GI1 and GI2 recombinant major capsid proteins. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 132-141 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164> EDN: <https://elibrary.ru/wnrjip>

For correspondence: Aleksey N. Mukhin, Ph.D. (Biol.), Leading Researcher, Vetbiochem LLC, 109316, Moscow, Russia. E-mai: amuhin@yahoo.com

Information about the authors:

Mukhin A.N., <https://orcid.org/0000-0001-7008-5212>

Alekseev K.P., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Selezneva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-5592-2948>

Moskvina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4542-8196>

Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Aliper T.I., <https://orcid.org/0000-0003-2696-1363>

Contribution: All the authors made a substantial contribution to the conception of the work, experiments, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Vetbiochem LLC (protocol No. 1 dated from Nov. 13, 2020).

Received 06 February 2023

Accepted 04 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) – остро протекающая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся явлениями геморрагического диатеза во всех органах, в особенности в лёгких и печени, возбудителями которой являются вирусы, относящиеся к семейству *Caliciviridae*, роду *Lagovirus*. ВГБК является одной из причин, наносящих высокий экономический ущерб кролиководству во всём мире, и эндемичной в Восточной Азии и Европе болезнью [1–7].

В настоящее время выделяют 4 геногруппы лаговировусов: две патогенные – G11 (G11a–G11d) и G12 и две непатогенные – G13 и G14 [8]. Оба патогенных варианта вируса ГБК встречаются на территории РФ [9–11].

Геном вируса представлен линейной молекулой РНК положительной полярности, состоящей из 7437 н.о. Вирусный капсид состоит из главного структурного белка VP60, кодируемого последовательностью нуклеотидов открытой рамки считывания 1 (ORF-1), и минорного белка VP-2.

Единственным методом специфической профилактики болезни является вакцинация кроликов с применением инактивированных тканевых или рекомбинантных вакцин. Вакцинация вызывает у кроликов образование антител к главному капсидному белку (Vp60), которые являются протективными. Несмотря на близкое антигенное родство вирусов, полноценная перекрёстная защита отсутствует, поэтому вакцина должна содержать капсидный антиген вирусов обоих генотипов [12, 13].

Несмотря на то что получение рекомбинантных главных капсидных белков вирусов ГБК и определение их иммуногенной активности были показаны рядом авторов [7, 14–18], коммерчески доступных вакцин на их основе, применяемых на территории РФ, не существует.

Целью данного исследования является оценка антигенной и иммуногенной активности вирусоподобных частиц (ВпЧ) на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов ГБК геногрупп G11 и G12 (recVP60-G11 и recVP60-G12).

Материалы и методы

Вирусы

В работе использовали:

– 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом «Воронежский-87» вируса ГБК, относящегося к геногруппе G11, с активностью в реакции гемагглютинации 1 : 2048 (10^4 ЛД₅₀/см³);

– 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом «Тула» вируса ГБК, относящегося к геногруппе G12, с активностью в реакции гемагглютинации 1 : 2048 (10^4 ЛД₅₀/см³).

*Получение рекомбинантных вирусов ядерного полиэдроса калифорнийской совки *Autographa californica* (AcNPV) со вставкой ORF-1 вируса ГБК генотипов G11 и G12*

Конструирование векторов, получение рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-G11 и AcORF-1-

G12, оценку и наработку продуктов осуществляли, как описано в предыдущей работе [19].

Фрагмент нуклеотидной последовательности гена ORF-1 вируса ГБК геногруппы G11:

```
GGATCCATGCATCACCATCACCATCATGGTTCC
GGATCTGGCAGTGGTTCAGGATCTGGTGGCAAGG
CTAGAGCAGTCCCCAAGGTGAGACTGCTGGCA
CCGCTACCACTGCTTCCGCTACCTGGAACCAAC
TGACGGTATGGACCCAGGTGTGGTTGCTACAACC
TCCGTGATCACTGCTGAGAACTCTTCAGCATCCA
TCGCTACCGCTGGTATCGGTGGACCACCTCAGCA
GGTGGACCAACAGGAGACCTGGAGGACCAACTT
CTACTACAACGACGTGTTACCTGGTCTGTGGCT
GACGCTCCTGGTTCATCCTGTACACTGTCCAGC
ACTCTCCACAGAACAATCCCTTCACCGCTGTGTT
GTCCCAGATGTATGCTGGTTGGGCAGGAGGCATG
CAGTTTCGCTTCATCGTGGCTGGTAGTGGTGTGT
TCGGAGGTCTGCTGGTTGCAGCTGTGATTCCTCC
AGGTATCGAGATTGGTCCAGGTCTGGAGGTGCGT
CAGTTCACACACGTCGTGATCGACGCTCGTAGCT
TGGAGCCTGTGACCATCACCATGCCAGACCTGCG
TCCCAACATGTACCATCCCACTGGTGACCCCGGT
CTCGTTCACCTGGTGCTGTCCGTGTACAACA
ACCTGATCAATCCCTTTGGAGGTTCCACCTCTGC
CATCCAGGTGACCGTGGAGACACGTCCCTCCGA
GGACTTCGAGTTCGTGATGATCCGTGCTCCAGC
TCCAAGACTGTGGACTCCATCTCTCCTGCTGGTC
TCCTGACCACACCTGTGCTGACCGGTGTTGGAAA
CGACAACCGTTGGAACGGTCAGATCGTTGGTCTG
CAACCAGTTCAGGTGGCTTCTCCACCTGCAACC
GTCACCTGGAACCTGAATGGATCCACCTATGGTTG
GAGCTCACCACGCTTCGCTGACATCGACCATCGT
AGAGGTTCTGCTAGCTATCCTGGCAACAATGCAA
CCAACGTGCTGCAGTTCTGGTACGCTAACGCTGG
TTCAGCTATCGACAATCCCATCTCCAGGTGGCTC
CTGACGGATTTCCAGACATGTCCTTCGTTCCCTT
CAATGGTCTGGCATTCCTGCTGCAGGTTGGGTT
GGATTTGGTGGCATCTGGAACCTCCAACCTCTGGTG
CTCCCAACGTGACCACTGTGCAAGCCTACGAGC
TTGGCTTTGCCACTGGTGCACCTGGCAACCTGCA
ACCCACTACCAACACCAGTGGTACCAACACCAG
TGGTGCTCAGACTGTGGCCAAGTCCATCTACGCT
GTTGTGACAGGTAAGTGCACAGAATCCAGCTGGA
CTCTTCGTGATGGCTTCTGGCATCATCTCCACCCC
CAACGCTTCTGCTATCACCTACACCCCACAACCT
GACCGCATCGTGAACCTACCCCTGGTACACCTGCAG
CTGCACCTGTGGGCAAGAACAACCTCCATCATGTT
TGCATCCGCTCGTGAGACGTAACCGGTGACGTGAAC
GCTACCGCTGGATCAGCCAACCGTACTCAGTATG
GTACAGGTTCCCAGCCCTTGCCTGTGACCATGG
TCTGTCCCTCAACAACCTACTCATCTGCTCTGATGC
CAGGTCAGTTCTTCGTGTGGCAGCTGACCTTCGC
TTCTGGCTTCATGGAGATTGGTCTGTCCGTGGAC
GGCTACTTCTATGCAGGAACCTGGTGCTTCCACTA
CCTTGATCGACCTGACCGAGCTGATCGACGTGAG
ACCAGTTGGTCTCGTCCCTCCAAGAGCACTCTG
GTGTTCAACCTGGGAGGTACAGCCAACGGCTTC
TCCTACGTGTAAGCTT.
```

Фрагмент нуклеотидной последовательности гена ORF-1 вируса ГБК геногруппы G12:

ATGCACCACCATCACCACCATGGTAAGGCTCG
TGCTGCTCCACAAGGAGAGACTGCTGGTACTGC
TACCACAGCTTCCGTTCTGGCACCCTACAGAT
GGCATGGACCCAGGTGTGGTTGCTACAACCTCA
GTTCGTGACCACTGAGAACGCTTCCACCTCCATT
GCTACCGCTGGTATCGGAGGTCCTCCACAGCAG
GTGGACCAACAGGAGACTTGGCGTACCAACTC
TACTACAACGACGTGTTACCTGGTTCAGTTGCTG
ACGCTCCTGGTAACATCCTGTACACTGTGCAGC
ACTCTCCACAGAACAATCCCTTCACTGCTGTGCT
GTCTCAGATGTATGCTGGATGGGCTGGTGGCATG
CAGTTTCGCTTTCATCGTTGCTGGTTCAGGTGTGT
TTGGTGGACGTCTCGTGGCTGCTGTGATTCTCTCC
AGGCATCGAGATTGGACCTGGTCTGGAAGTGCG
TCAGTTTCTCACGTTGTGATCGATGCTCGCTCC
TTGGAGCCCGTGACCATCACTATGCCCGACCTGC
GTCCCAACATGTACCATCCCCTGGCAACCCTGG
TCTGGTACCCACCTTGGTGTGTCCCGTGTACAAC
AACCTGATCAATCCCTTTGGTGGAAAGCACCTCTG
CTATCCAGGTGACCGTGGAGACCCGTCCTCCCG
AGGACTTCGAGTTCGTGATTCGTTGCTGCTCCAG
CTCCAAGACCGTGGACTCCATCTCCCTGCTGA
CCTCCTGACCACACCAGTGTGCTGACTGGAGTTGG
AACCGACAACAGATGGAACGGTGGAGATCGTTGG
ACTGCAACCAGTTCAGGAGGTTTCTCCACCTG
CAACCGTCACTGGAACCTGAATGGTTCACCTT
CGGATGGTCTCTCCACGCTTCGCTGCTATCGAC
CACGATCGTGGCAATGCTTCTTCTGGATCAT
CCAGTCCAACGTGCTGGAGTTGTGGTATGCTTC
AGCTGGTTCGCTGCTGACAATCCCATCTCTCAG
ATTGCTCCAGATGGCTTCTCTGACATGTCCTTCG
TACCTTCTCAGGTGCAACCATTCCCCTGCTGG
CTGGGTTGGCTTTGGAGGTATCTGGAACAGCAA
CAACGGTGTCTCCCTTCGTGACCACCGTGCAGGC
TTACGAACTGGGATTCGCTACCCGAGCTCCCTCC
AATCCTCAACCCACTACCAACAACCTCTGGTGCTC
AGATCGTAGCTAAGTCCATCTATGGTGTGGCTAA
CGGTATCAACCAGACCACTGCTGGTCTGTTTCGTG
ATGGCTTCAGGTGTGATCAGCACACCCAACTCCT
CCGCTATCACCTACACTCCTCAACCTAACCGTAT
CGTGAACGCTCCAGGCACACCTGCTGCAGCTCC
CATTGGTAAGAACACACCCATCATGTTTCGCTTCC
GTGGTTCGCTCGCACTGGAGACATCAACGCTGAA
GCTGGTTCACCAACGGAACCTCAGTATGGTGTGCT
GGATCCCAACCATTCCTGTCACTGTGGGACTGT
CCCTGAACAACCTACTCATCTGCTCTGATGCCAGG
TCAGTTCTTCGTGTGGCAGCTGAACCTTTGCTTCC
GGTTTCATGGAACCTCGGTCTGTCCGTGGATGGCT
ACTTCTATGCTGGTACTGGAGCTTCAGCTACCTT
GATCGACCTGTCTGAGCTGGTGGACATTCGTCCT
GTTGGTCCACGTCCTCCACCTCCACCTTGGTCT
ACAACCTCGGAGGCACTACCAACGGATTCTCCT
ACGTGTAA.

*Определение гемагглютинирующей активности
recVP60-G11 и recVP60-G12*

Реакцию гемагглютинации ставили с 0,75% суспензией эритроцитов человека группы О (I группы) в 0,15 М фосфатно-буферного раствора (ФБР) pH 7,2 микрометодом на полистироловых планшетах с U-образным дном

по общепринятой методике. В качестве положительного контроля использовали 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом вируса ГБК «Воронежский-87», и 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом вируса ГБК «Тула». В качестве отрицательного контроля использовали 10% печень от заведомо здорового кролика и лизат культуры клеток Hi-5, инфицированные AcNPV без вставки. За титр принимали максимальное разведение АГ, дающее гемагглютинацию.

Электронная микроскопия

На электронно-микроскопическую медную сетку, покрытую парлодиевой плёнкой, наносили 5 мкл раствора смеси 1 : 1 очищенных гесVP60-G11 и гесVP60-G12 в концентрации 10 мг/мл по общему белку в 0,15 М ФБР (pH 7,2), отмывали водой от несвязавшихся компонентов и окрашивали 1% водным раствором уранилацетата (pH 4,5). Образцы просматривали с помощью электронного микроскопа просвечивающего типа HT7700 (Hitachi, Япония).

Определение антигенной активности

Антигенную активность ВпЧ на основе рекомбинантных белков исследовали на клинически здоровых кроликах возраста 1,5–3,0 месяца. В исследовании использовали 4 группы животных по 20 голов в каждой. Первой группе животных внутримышечно вводили гесVP60-G11 в дозе 50 мкг, 2-й группе – гесVP60-G12 в дозе 50 мкг, 3-й группе – смесь 25 мкг гесVP60-G11 и 25 мкг гесVP60-G12, а животных 4-й группы не вакцинировали. Сыворотки крови кроликов, взятые до иммунизации и на 21-й день после неё, исследовали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с целью выявления специфических антител к вирусу ГБК. ИФА ставили, как описано в работе [20].

Определение иммуногенной активности

На 21-е сутки после иммунизации кроликов заражали вирулентными штаммами «Воронежский-87» вируса ГБК генотипа G11 (50% животных) и «Тула» вируса ГБК генотипа G12 (50% животных) в дозе 10^3 ЛД₅₀. Наблюдение за животными проводили в течение 7 дней после заражения: отмечали гибель и появление клинических признаков. От погибших животных отбирали печень, сердце, селезёнку, лёгкие и почки для исследования с помощью ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция в реальном времени) с целью обнаружения РНК вируса ГБК. На 7-е сутки все выжившие животные были подвергнуты эвтаназии, пробы паталогического материала также исследовали с применением ПЦР-РВ.

Иммуногенную активность гесVP60 для кроликов вычисляли по формуле (1):

$$IA = (ЛК - ЛИ) / ЛК \times 100\%, \quad (1)$$

где IA – иммуногенная активность; ЛК – летальность в контрольной группе (%); ЛИ – летальность среди иммунизированных животных (%).

ПЦР-РВ

Для выделения тотальной РНК готовили 10% суспензии из образцов печени кроликов, полученные

путём гомогенизации проб в стерильном ФБР и далее подвергшиеся центрифугированию при 13 200 об/мин в течение 5 мин. Суммарную РНК экстрагировали из каждой ткани кроликов с TRIzol (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Наличие РНК вируса ГБК определяли методом ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) с использованием универсальной пары праймеров, разработанных М. Pawlikowska и соавт. [21]. Для дифференциации вирусов второго генотипа использовали ОТ-ПЦР в РВ, описанную у К.Р. Dalton и соавт. [22]. ОТ-ПЦР проводили с помощью набора One-tube real-time RT-PCR kit («Альфа Фермент», Россия).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES July, 23, 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом ООО «Ветбиохим» (протокол № 1 от 13.11.2020).

Результаты

В результате проведённых работ были получены рекомбинантные вирусы ядерного полиодроза калифорнийской совки *Autographa californica* (AcNPV) со вставкой ORF-1 вируса ГБК генотипа G11 (AcORF-1-G11) и генотипа G12 (AcORF-1-G12).

При заражении культуры клеток Sf-9 рекомбинантными бакуловirusами на 3–4-е сутки после заражения отмечали цитопатические изменения в инфицированных культурах. Титрование полученных вирусосодержащих суспензий методом бляшкообра-

зования показало наличие рекомбинантных бакуловirusов AcORF-1-G11 и AcORF-1-G12 в титрах – $10^{5,0}$ – $10^{5,5}$ БОЕ₅₀/см³.

При заражении культуры клеток Hi-5 рекомбинантными бакуловirusами со множественностью 0,1 БОЕ₅₀/клетка отмечали экспрессию *recVP60-G11* и *recVP60-G12*. После очистки 1 г клеточных осадков было получено 5 мл препарата *recVP60-G11* с концентрацией общего белка 20 мг/мл и 4 мл препарата *recVP60-G12* с концентрацией общего белка 18 мг/мл.

Гемагглютинирующая активность очищенных препаратов *recVP60-G11* и *recVP60-G12* с концентрацией 50 мкг/мл в ФБР составила 1 : 32 000.

В 0,15 М ФБР с pH 7,2–7,4 рекомбинантные белки образовывали ВпЧ. В растворах *recVP60-G11*, *recVP60-G12* и их смеси 1 : 1 с концентрацией по общему белку 10 мг/мл при проведении электронной микроскопии наблюдали ВпЧ размером 30–40 нм (**рисунок**).

До вакцинации животные были серонегативны в отношении вируса ГБК: уровень антител в ИФА составил < 1 : 200 (1 : 200 – минимальное разведение сыворотки, используемое в тест-системе ИФА).

На 21-е сутки после однократного введения ВпЧ с содержанием 50 мкг рекомбинантных капсидных белков у всех иммунизированных кроликов наблюдался синтез специфических антител к главным капсидным белкам вируса ГБК. Уровень антител составил 1 : 200–1 : 800, у кроликов контрольной группы сероконверсии не наблюдалось (**табл. 1, 2**).

После контрольного заражения вирулентным штаммом вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» выжили 9 из 10 животных, иммунизированных

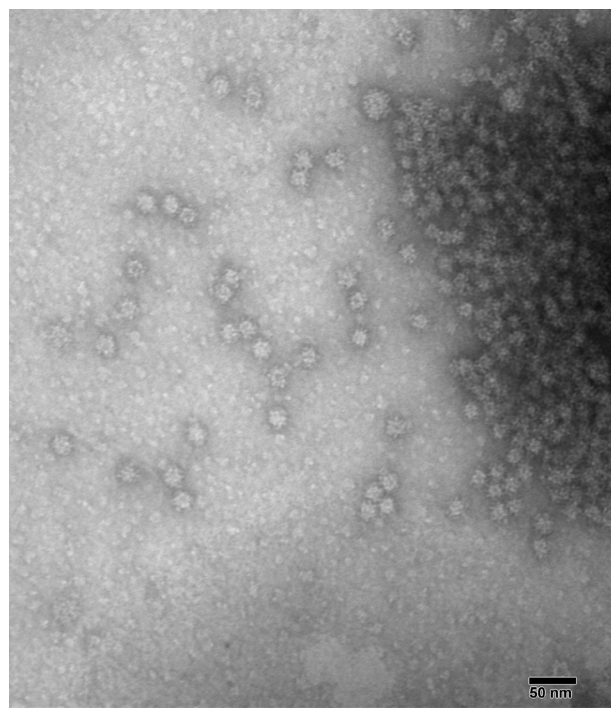
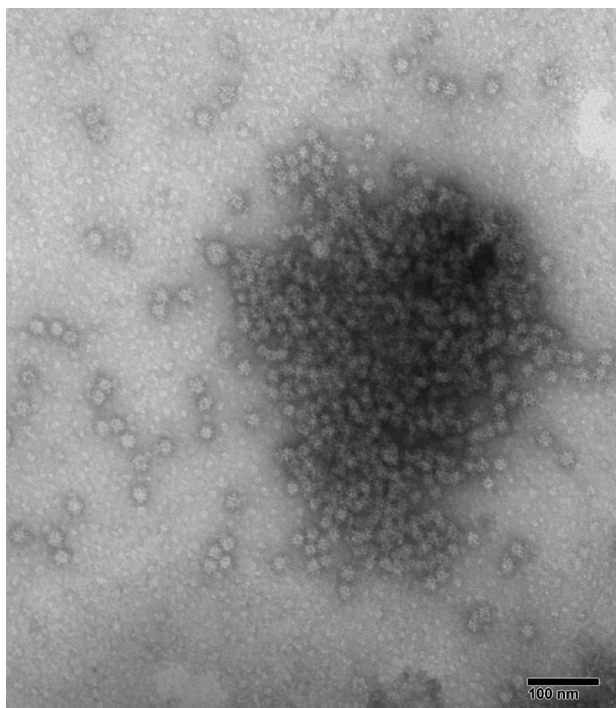


Рис. Электронно-микроскопическое изображение вирусоподобных частиц *recVP60*.

Fig. Transmission electron microscopy images of *recVP60* virus-like particles.

Таблица 1. Результаты контрольного заражения кроликов вирулентным штаммом вируса геморрагической болезни кроликов GI1
Table 1. Results of the challenge experiment with virulent rabbit hemorrhagic disease virus GI1

Группа Group	№ животного Animal No.	Титр антител в ИФА Antibody titer in ELISA	Результаты ПЦР PCR results	Результат контрольного заражения 10 ³ ЛД ₅₀ «Воронежский-87» Results of challenge with 10 ³ LD ₅₀ of "Voronezsky-87" strain	
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1	1	1 : 400	–	жив	
	2	1 : 400	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 400	–	жив	
	5	1 : 200	–	жив	
	6	1 : 200	+	пал	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			1	9
Летальность 10% Mortality 10%			Иммуногенная активность 90% Immunogenic activity 90%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.2	1	1 : 400	+	пал	
	2	1 : 400	+	пал	
	3	1 : 800	+	пал	
	4	1 : 200	+	пал	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	+	пал	
	7	1 : 400	+	пал	
	8	1 : 400	+	пал	
	9	1 : 400	–	жив	
	10	1 : 800	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			7	3
Летальность 70% Mortality 70%			Иммуногенная активность 30% Immunogenic activity 30%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1 + Rec VP60-GI.2	1	1 : 800	–	жив	
	2	1 : 800	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 200	+	пал	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	–	жив	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			1	9
Летальность 10% Mortality 10%			Иммуногенная активность 90% Immunogenic activity 90%		
Контрольная группа (не иммунизировали) Control group (non-immunized)	1	< 1 : 200	+	+	пал
	2	< 1 : 200	+	+	пал
	3	< 1 : 200	+	+	пал
	4	< 1 : 200	+	+	пал
	5	< 1 : 200	+	+	пал
	6	< 1 : 200	+	+	пал
	7	< 1 : 200	+	+	пал
	8	< 1 : 200	+	+	пал
	9	< 1 : 200	+	+	пал
	10	< 1 : 200	+	+	пал
	Всего пало/выжило Total died/survived			10	0
Летальность 100% Mortality 100%					

Таблица 2. Результаты контрольного заражения кроликов вирулентным штаммом вируса геморрагической болезни кроликов GI2
Table 2. Results of the challenge experiment with virulent rabbit hemorrhagic disease virus GI2

Группа Group	№ животного Animal No.	Титр антител в ИФА Antibody titer in ELISA	Результаты ПЦР PCR results	Результат контрольного заражения 10 ³ ЛД ₅₀ «Тула» Results of challenge with 10 ³ LD ₅₀ of «Tula» strain	
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1	1	1 : 400	–	жив	
	2	1 : 400	+	пал	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 400	+	пал	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	+	пал	
	7	1 : 400	+	пал	
	8	1 : 200	+	пал	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	+	пал	
	Всего пало/выжило Total died/survived			6	4
Летальность 60% Mortality 60%			Иммуногенная активность 40% Immunogenic activity 40%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.2	1	1 : 400	–	жив	
	2	1 : 400	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 200	–	жив	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	–	жив	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 400	–	жив	
	10	1 : 800	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			0	10
Летальность 0% Mortality 0%			Иммуногенная активность 100% Immunogenic activity 100%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1 + Rec VP60-GI.2	1	1 : 800	–	жив	
	2	1 : 800	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 200	–	жив	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	–	жив	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			0	10
Летальность 0% Mortality 0%			Иммуногенная активность 100% Immunogenic activity 100%		
Контрольная группа (не иммунизировали) Control group (non-im- munized)	1	< 1 : 200	+	+	пал
	2	< 1 : 200	+	+	пал
	3	< 1 : 200	+	+	пал
	4	< 1 : 200	+	+	пал
	5	< 1 : 200	+	+	пал
	6	< 1 : 200	+	+	пал
	7	< 1 : 200	–	–	жив
	8	< 1 : 200	+	+	пал
	9	< 1 : 200	+	+	пал
	10	< 1 : 200	+	+	пал
	Всего пало/выжило Total died/survived			9	1
Летальность 90% Mortality 90%					

гесVP60-GI1 и смесью гесVP60-GI1 и гесVP60-GI2 (иммуногенная активность 90%, летальность 10%) Иммуногенная активность гесVP60-GI2 составила 30%, т.е. из 10 иммунизированных кроликов выжило 3 (летальность 70%). При этом в контрольной группе отмечалась 100% летальность.

После контрольного заражения вирулентным штаммом вируса ГБК 2-го генотипа «Тула» выжили все животные, иммунизированные гесVP60-GI2 и смесью гесVP60-GI1 и гесVP60-GI2 (иммуногенная активность 100%), иммуногенная активность гесVP60-GI1 составила 40%. В контрольной группе отмечалась 90% летальность.

Гибель кроликов наступала в течение 12–72 ч после заражения. У всех погибших кроликов в образцах патологического материала из печени, сердца, селезенки, почек и лёгких методом ПЦР был обнаружен генетический материал вируса ГБК генотипа, соответствующего вирусу, использованному для контрольного заражения.

У всех выживших кроликов, подвергнутых эвтаназии на 7-е сутки после заражения, в образцах патологического материала из печени, сердца, селезенки, почек и лёгких методом ПЦР генетического материал вируса ГБК обнаружено не было (табл. 1, 2).

Обсуждение

Как и нативные лаговирuсы, очищенные препараты гесVP60-GI1 и гесVP60-GI2 и их смесь обладали гемагглютинирующей активностью, что говорило о возможности образования молекулами гесVP60 в 0,15 М растворе ФБР ВпЧ. Электронная микроскопия показала наличие ВпЧ размером около 30–40 нм. Структуры, состоящие из рекомбинантных VP60, напоминали капсид калицивирусов.

Изучение антигенной активности полученных на основе гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 ВпЧ показало, что введение кроликам ВпЧ из белка как одного варианта, так и их смеси, вызывает синтез специфических антител. На 21-е сутки после введения рекомбинантных капсидных белков у всех иммунизированных животных уровень антител в ИФА стал 1 : 200 и выше.

Наличие антигенных свойств у ВпЧ на основе рекомбинантных главных капсидных белков открывает широкие перспективы использования их в качестве компонентов препаратов для специфической профилактики ВГБК у кроликов.

Результаты контрольного заражения показали разницу в иммуногенности ВпЧ на основе рекомбинантных белков при заражении вирусами разных генотипов. Иммуногенная активность против гетерологичного вируса не превышала 40%, тогда как при использовании вируса такого же генотипа или в случае иммунизации кроликов ВпЧ на основе смеси рекомбинантных белков иммуногенная активность была 90–100%. Данные результаты хорошо соотносятся с ранее известным феноменом – ограниченной защитой кроликов, вакцинированных вакцинами против ВГБК, изготовленных на основе штаммов 1-го генотипа, при заражении лаговирuсами 2-го генотипа [12, 13].

Учитывая высокое антигенное родство лаговирuсов 1-го и 2-го генотипов и то, что использованная нами тест-система ИФА не позволяла дифференцировать антитела к капсидным белкам разных генотипов вируса ГБК, связь между уровнем антител и способностью животных противостоять контрольному заражению оценивали только для кроликов иммунизированных монопрепаратами.

Проводимые серологические исследования показали, что выжили все кролики, имевшие до контрольного заражения уровень антител к вирусу ГБК 1 : 400 и выше.

Среди животных, иммунизированных ВпЧ на основе гесVP60-GI.1 и заражённых вирусом ГБК 1-го генотипа, два кролика на момент заражения имели антитела на уровне 1 : 200. Из них пал только один. В группе, иммунизированной ВпЧ на основе гесVP60-GI.2 и заражённой вирусом ГБК 2-го генотипа, оба кролика с титром антител 1 : 200 выжили. При этом вирулентность в контрольной группе, заражённой вирусом ГБК 1-го генотипа, была в целом выше вирулентности в контрольной группе, заражённой вирусом ГБК 2-го генотипа.

Заключение

Таким образом, полученные в бакуловирусной системе экспрессии генов главные капсидные белки вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в 0,15 М ФБР с pH 7,2–7,4 образуют ВпЧ. Их введение как в моновариантах, так и в смеси вызывает у кроликов синтез специфических антител и защищает животных при контрольном заражении вирулентными штаммами «Воронежский-87» вируса ГБК генотипа GI1 и «Тула» вируса ГБК генотипа GI2 в дозе 10^3 ЛД₅₀ на уровне 90–100%. Уровень специфических антител к вирусу ГБК в ИФА 1 : 400 и выше защищает при контрольном заражении 100% животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Quian N.H. A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 1984; 16(6): 253–5.
2. Mitro S., Krauss H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur. J. Epidemiol.* 1993; 9(1): 70–8. <https://doi.org/10.1007/bf00463093>
3. Puggioni G., Cavadini P., Maestrone C., Scivoli R., Botti G., Ligios C., et al. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.* 2013; 44(1): 96. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-96>
4. Abrantes J., Lopes A.M., Dalton K.P., Melo P., Correia J.J., Ramada M., et al. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11): 1900–1902. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130908>
5. Dalton K.P., Nicieza I., Abrantes J., Esteves P.J., Parra F. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* 2014; 169(1–2): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.015>
6. Duarte M., Henriques M., Barros S.C., Fagulha T., Ramos F., Luis T., et al. Detection of RHDV variant 2 in domestic rabbits in Azores. *Vet. Rec.* 2015; 176(19): 499–500. <https://doi.org/10.1136/vr.h2402>
7. OIE. Rabbit Haemorrhagic Disease. USA; 2020. Available at: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=34728

8. Le Pendu J., Abrantes J., Bertagnoli S., Guitton J.S., Le Gall-Reculé G., Lopes A.M., et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(7): 1658–66. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000840>
9. Мухин А.Н., Южаков А.Г., Селезнева Е.В., Дроздова Е.И., Верховский О.А., Алипер Т.И. Вспышка заболевания, вызванная вирусом геморрагической болезни кроликов 2-го генотипа на территории РФ. *Аграрная наука.* 2021; (4): 25–7. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-25-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/ynmqnh>
10. Burmakina G., Malogolovkina N., Lunitsin A., Titov I., Tsybanov S., Malogolovkin A. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus strains originating from outbreaks in the Russian Federation. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1973–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2864-1>
11. ФГБНУ ФИЦВиМ. Третий случай обнаружения вируса геморрагической болезни кроликов нового типа – ВГБК-2 в Российской Федерации. Available at: <https://ficvim.ru/2019/02/tretij-sluchaj-obnaruzheniya-virusa-gemorragicheskoy-bolezni-krolikov-novogo-tipa-vgbk-2-v-rossijskoj-federacii/> (in Russian)
12. Le Gall-Recule G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., et al. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* 2013; 44(1): 81. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>
13. Peacock D., Kovaliski 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. <https://doi.org/10.1136/vr.104135>
14. Власова Н.Н., Власов Н.А., Алексеев К.П. Конструирование плазмидного вектора, экспрессирующего VP60 вируса геморрагической болезни кроликов. *Ветеринария.* 2006; (11): 53–5. <https://www.elibrary.ru/hvjxut>
15. Gromadzka B., Szewczyk B., Konopa G., Fitzner A., Kesy A. Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta Biochim. Pol.* 2006; 53(2): 371–6.
16. Guo H., Zhu J., Tan Y., Li C., Chen Z., Sun S., et al. Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits. *Antiviral Res.* 2016; 131: 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.011>
17. López-Vidal J., Gómez-Sebastián S., Bárcena J., Nuñez Mdel C., Martínez-Alonso D., Dudognon B., et al. Improved production efficiency of virus-like particles by the baculovirus expression vector system. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140039>
18. Qi R., Miao Q., Zhu J., Tang J., Tang A., Wang X., et al. Construction and immunogenicity of novel bivalent virus-like particles bearing VP60 genes of classic RHDV(GL1) and RHDV2(GL2). *Vet. Microbiol.* 2020; 240: 108529. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108529>
19. Алексеев К.П., Москвина А.С., Верховский О.А., Селезнева Е.В., Черных О.Ю., Мухин А.Н. Получение рекомбинантного капсидного белка VP60 вируса геморрагической болезни кроликов и изучение его антигенной и иммуногенной активности. *Ветеринария Кубани.* 2020; (5): 34–7. <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2020-5-34-37> EDN: <https://www.elibrary.ru/vxzzjm>
20. Selezneva E.V., Mukhin A.N., Ezdakova I.Yu., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. The application of recombinant Vp60-based ELISA for haemorrhagic disease virus antibody detection to vaccination against RHD. *AIP Conf. Proc.* 2022; 2467: 070028-1–070028-5. <https://doi.org/10.1063/5.0092529>
21. Pawlikowska M., Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W. Phylogenetic analysis of selected strains of Rabbit haemorrhagic disease virus on the basis of N-terminal fragment of the gene encoding structural protein VP60. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2010; 54: 129–33.
22. Dalton K.P., Arnal J.L., Benito A.A., Chacón G., Martín Alonso J.M., Parra F. Conventional and real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) and its recombinants. *J. Virol. Methods.* 2018; 251: 118–22. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.009>

REFERENCES

1. Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Quian N.H. A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 1984; 16(6): 253–5.
2. Mitro S., Krauss H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur. J. Epidemiol.* 1993; 9(1): 70–8. <https://doi.org/10.1007/bf00463093>
3. Puggioni G., Cavadini P., Maestrone C., Scivoli R., Botti G., Ligios C., et al. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.* 2013; 44(1): 96. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-96>
4. Abrantes J., Lopes A.M., Dalton K.P., Melo P., Correia J.J., Ramada M., et al. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11): 1900–1902. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130908>
5. Dalton K.P., Nicieza I., Abrantes J., Esteves P.J., Parra F. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* 2014; 169(1–2): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.015>
6. Duarte M., Henriques M., Barros S.C., Fagulha T., Ramos F., Luis T., et al. Detection of RHDV variant 2 in domestic rabbits in Azores. *Vet. Rec.* 2015; 176(19): 499–500. <https://doi.org/10.1136/vr.h2402>
7. OIE. Rabbit Haemorrhagic Disease. USA; 2020. Available at: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/ReviewReport/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=34728
8. Le Pendu J., Abrantes J., Bertagnoli S., Guitton J.S., Le Gall-Reculé G., Lopes A.M., et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(7): 1658–66. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000840>
9. Mukhin A.N., Yuzhakov A.G., Selezneva E.V., Drozdova E.I., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. Outbreak of the disease caused by the rabbit hemorrhagic disease virus 2 in the Russian Federation. *Agrarnaya nauka.* 2021; (4): 25–7. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-25-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/ynmqnh> (in Russian)
10. Burmakina G., Malogolovkina N., Lunitsin A., Titov I., Tsybanov S., Malogolovkin A. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus strains originating from outbreaks in the Russian Federation. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1973–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2864-1>
11. Federal Research Center for Virology and Microbiology. The third case of detection of a new type of rabbit hemorrhagic disease virus – VGBK-2 in the Russian Federation. Available at: <https://ficvim.ru/2019/02/tretij-sluchaj-obnaruzheniya-virusa-gemorragicheskoy-bolezni-krolikov-novogo-tipa-vgbk-2-v-rossijskoj-federacii/> (in Russian)
12. Le Gall-Recule G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., et al. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* 2013; 44(1): 81. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>
13. Peacock D., Kovaliski 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. <https://doi.org/10.1136/vr.104135>
14. Vlasova N.N., Vlasov N.A., Alekseev K.P. Construction of plasmid vector of expressing virus of haemorrhagic disease of rabbits. *Veterinariya.* 2006; (11): 53–5. <https://www.elibrary.ru/hvjxut> (in Russian)
15. Gromadzka B., Szewczyk B., Konopa G., Fitzner A., Kesy A. Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential

- vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta Biochim. Pol.* 2006; 53(2): 371–6.
16. Guo H., Zhu J., Tan Y., Li C., Chen Z., Sun S., et al. Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits. *Antiviral Res.* 2016; 131: 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.011>
 17. López-Vidal J., Gómez-Sebastián S., Bárcena J., Nuñez Mdel C., Martínez-Alonso D., Dudognon B., et al. Improved production efficiency of virus-like particles by the baculovirus expression vector system. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140039>
 18. Qi R., Miao Q., Zhu J., Tang J., Tang A., Wang X., et al. Construction and immunogenicity of novel bivalent virus-like particles bearing VP60 genes of classic RHDV(GI.1) and RHDV2(GI.2). *Vet. Microbiol.* 2020; 240: 108529. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108529>
 19. Alekseev K.P., Moskvina A.S., Verkhovskiy O.A., Selezneva E.V., Chernykh O.Yu., Mukhin A.N. Obtaining recombinant capsid protein VP60 of rabbit haemorrhagic disease virus and its antigenic and immunogenic activity study. *Veterinariya Kubani.* 2020; (5): 34–7. <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2020-5-34-37> EDN: <https://www.elibrary.ru/vxzgjm> (in Russian)
 20. Selezneva E.V., Mukhin A.N., Ezdakova I.Yu., Verkhovsky O.A., Aliper T.I. The application of recombinant Vp60-based ELISA for haemorrhagic disease virus antibody detection to vaccination against RHD. *AIP Conf. Proc.* 2022; 2467: 070028-1–070028-5. <https://doi.org/10.1063/5.0092529>
 21. Pawlikowska M., Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W. Phylogenetic analysis of selected strains of Rabbit haemorrhagic disease virus on the basis of N-terminal fragment of the gene encoding structural protein VP60. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2010; 54: 129–33.
 22. Dalton K.P., Arnal J.L., Benito A.A., Chacón G., Martín Alonso J.M., Parra F. Conventional and real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) and its recombinants. *J. Virol. Methods.* 2018; 251: 118–22. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.009>