УДК 636.09:616.98: 578.82/.83

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-25-27>

Оригинальное исследование/Original research

Мухин А.Н.^{1,2},
Южаков А.Г.^{2,3},
Селезнева Е.В.^{2,3},
Дроздова Е.И.³,
Верховский О.А.¹,
Алипер Т.И.^{2,3}

¹ АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16, стр. 2

² ООО «Ветбиохим», 105120, Москва, 3-й Сыромятнический пер., д. 3/9, стр. 2

³ ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1
E-mail: amuhin@yahoo.com, anton_oskol@mail.ru

Ключевые слова: вирусная геморрагическая болезнь кроликов, вирус геморрагической болезни кроликов 2-го генотипа, ИФА, ОТ-ПЦР, определение нуклеотидной последовательности

Для цитирования: 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; 348 (4): 25–27.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-25-27>**Конфликт интересов отсутствует**

Alexey N. Mukhin^{1,2},
Anton G. Yuzhakov^{2,3},
Ekaterina V. Selezneva^{2,3},
Elena I. Drozdova³,
Oleg A. Verkhovsky¹,
Taras I. Aliper^{2,3}

¹ Independent Non-Profit Organization "Diagnostic and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases", 16 Gamalei st., Moscow, 123098

² "Vetbiochem ООО" (Limited Liability Company), 3/9-2 3-j Syromyatnicheskij per. st., Moscow, 105120

³ Federal Scientific Centre VIEV, 24-1 Ryazanskij prospect st., Moscow, 109428

Key words: rabbit haemorrhagic disease, rabbit haemorrhagic disease type 2 virus, ELISA, OT-PCR, nucleotide sequence

For citation: Mukhin A.N., Yuzhakov A.G., Selezneva E.V., Drozdova E.I., Verkhovsky O.A., Aliper T.I. Outbreak of the disease caused by the rabbit hemorrhagic disease virus 2 in the Russian Federation. *Agrarian Science*. 2021; 348 (4): 25–27. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-25-27>**There is no conflict of interests**

Вспышка заболевания, вызванная вирусом геморрагической болезни кроликов 2-го генотипа на территории РФ

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Вирус геморрагической болезни кроликов 2-го типа (ВГБК-2) (rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV GI2, RHDV-2)) впервые был обнаружен в 2010 году во Франции и быстро распространился по европейским странам. В отличие от штаммов первой генотипической группы, RHDV GI2 поражает и кроликов моложе двух месяцев, а также различные виды зайцев. Кроме того, RHDV GI2 вызывает гибель кроликов, вакцинированных вакцинами, изготовленными на основании вирусов геморрагической болезни 1-го генотипа. Летом 2019 года в приусадебном хозяйстве в Тульской области произошла вспышка заболевания кроликов, характеризующаяся внезапной гибелью кроликов разных возрастных групп. Целью нашей работы было обнаружение и получение молекулярно-генетической характеристики возбудителя.

Методы. Образцы патологического материала от павших животных были исследованы в ИФА с целью выявления антигена ВГБК и в ОТ-ПЦР с использованием пары праймеров, амплифицирующих фрагмент длиной 510 нуклеотидов, включающий участки генов VP1 и VP60. В дальнейшем проводили секвенирование по Сэнгеру на геномном анализаторе AB3130, компьютерный анализ полученных последовательностей и построение филогенетических дендрограмм.

Результаты. Лабораторные исследования образцов печени павших животных в ИФА и ОТ-ПЦР показали наличие антигена и РНК вируса геморрагической болезни кроликов. Анализ нуклеотидной последовательности участка генома длиной 470 пар оснований, содержащего 5-концевой участок гена VP1 и 3-концевой участка гена VP60, показал, что выявленный вирус принадлежит к ВГБК 2-го генотипа. Наиболее близкими к нему оказались последовательности вирусов из США, Франции и Польши, выделенные в период 2016–2020 годов. В аминокислотной последовательности белка VP60 выявленный вирус содержит замену А46Т (аланин на треонин в позиции 46), что может влиять на конформацию капсидного белка, и как следствие, антигенную структуру вируса.

Outbreak of the disease caused by the rabbit hemorrhagic disease virus 2 in the Russian Federation

ABSTRACT

Relevance. Rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV-2, GI2,) was first detected in 2010 in France and quickly spread across European countries. Unlike strains of the first genogroup, RHDV GI2 also affects rabbits under 2 months old, as well as various types of hares. In addition, RHDV GI2 causes the death of rabbits vaccinated with vaccines based on type 1 hemorrhagic disease viruses. The rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV-2) was detected during an outbreak of the disease, characterized by the sudden death of rabbits of different age groups, in the summer of 2019 in a private farm in the Tula region, Russia. The purpose of this study was to detect and obtain the molecular genetic characteristics of the pathogen.

Methods. The ELISA was used for the detection of RHDV antigen in samples of pathological material from dead animals. The presence of RHDV RNA was determined by the method of reverse transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR) using pair of specific primers for the regions of the VP1 and VP60 genes. The Sanger sequencing reaction was performed and obtained nucleotide sequences were analyzed.

Results. Antigen and RNA of the rabbit haemorrhagic disease virus were detected by ELISA and RT-PCR in laboratory studies of the liver of dead animals. Analysis of the nucleotide sequence of a 470 base pair region of the genome, containing the 5' terminal region of the VP1 gene and the 3' terminal region of the VP60 gene, showed that the detected virus belongs to RHDV-2. Phylogenetic analysis revealed that the closest to it were the sequences of RHDV-2 from the USA, France and Poland isolated in the 2016–2020. The VP60 amino acid sequence of detected virus contained the A46T substitution (alanine for threonine at position 46), which can affect the conformation of the capsid protein and, as a consequence, the antigenic structure of the virus.

Поступила: 1 апреля
После доработки: 17 апреля
Принята к публикации: 18 апреля

Received: 1 April
Revised: 17 April
Accepted: 18 April

Введение

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) — остро протекающая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся явлениями геморрагического диатеза во всех органах, в особенности в легких и печени, возбудителями которой являются вирусы, относящиеся к семейству *Caliciviridae*, роду *Lagovirus*.

В настоящее время выделяют 4 геногруппы лаговировусов, две патогенные: GI1 (GI1a–GI1d) и GI2, и две не патогенные: GI3 и GI4 [3].

Вирус геморрагической болезни кроликов 2-го типа (ВГБК-2) (rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV GI2, RHDV-2)) впервые был обнаружен в 2010 году во Франции [2] и быстро распространился по европейским странам.

В отличие от штаммов первой геногруппы, RHDV GI2 поражает и кроликов моложе двух месяцев, а также различные виды зайцев [1, 7]. Кроме того, RHDV GI2 вызывает гибель кроликов, вакцинированных вакцинами, изготовленными на основании вирусов геморрагической болезни 1-го генотипа.

Данные особенности позволили RHDV GI2 заместить RHDV GI1, вызывая разрушительные вспышки и быстро становясь эндемичным в Европе, Азии, Африке и Австралии. В последнее время из-за более широкого спектра хозяев RHDV-2 стал эндемичным также для дикой фауны Северной и Центральной Америки [4, 5].

Секвенирование гена VP60 показало, что ВГБК-2 представляет собой новую филогенетическую группу, попадающую между европейскими и австралийскими непатогенными штаммами, с идентичностью 80–82% с другими лаговир usernameами [2].

Сотрудниками ФГБНУ ФИЦВИМ сообщалось о как минимум трех случаях выявления вирусов данного генотипа на территории РФ [8].

Летом 2019 года в приусадебном хозяйстве в Тульской области произошла вспышка заболевания кроликов, характеризующаяся внезапной гибелью кроликов разных возрастных групп, включая животных, ранее вакцинированных ассоциированной вакциной против миксоматоза и вирусной геморрагической болезни кроликов, и новорожденных крольчат.

Целью нашей работы было обнаружение и получение молекулярно-генетической характеристики возбудителя.

Материалы и методы

Образцы. От павших животных были отобраны образцы патологического материала.

ИФА. Для выявления антигена ВГБК в патматериале использовали ИФА тест-систему INgezim RHDV DAS 1.7.RHD.K.2 (Ingenaza, Испания).

В соответствии с рекомендациями производителя исследовали 10%-ную суспензию образцов печени.

ПЦР и секвенирование. Для выделения тотальной РНК готовили 10%-ные суспензии образцов печени кроликов, полученные гомогенизацией проб в стерильном PBS и подвергали центрифугированию при 13200 об/мин в течение 5 мин. Выделение РНК проводили при помощи «Набора для выделения РНК» (ООО «Ветбиохим», Россия) по методике производителя.

Наличие РНК вируса геморрагической болезни кроликов определяли методом обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием пары праймеров, разработанных Pawlikowska с соавторами [6], амплифицирующих фрагмент длиной 510 нуклеотидов, включающий участки генов VP1 и VP60. ОТ-ПЦР проводили с помощью набора «One-tube real-time RT-PCR kit» (АльфаФермент, Россия). Детекцию продуктов амплификации проводили в 1%-ном агарозном геле. Нарботанные в ОТ-ПЦР фрагменты выделяли из геля при помощи набора «Cleanup Mini» (Евроген, Россия). Секвенирование по Сэнгеру проводили при помощи праймеров для ОТ-ПЦР и набора реагентов «Big Dye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США) по методике производителя на геномном анализаторе AB3130 (Applied Biosystems, США).

Компьютерный анализ полученных последовательностей проводили при помощи пакета программ Lasergene 11.1.0. (DNASTAR, США). Филогенетические дендрограммы строили при помощи программы MEGA 7.0.18 (США).

Результаты и обсуждение

По результатам анализа анамнеза и патологоанатомического вскрытия был поставлен предположительный диагноз «вирусная геморрагическая болезнь кроликов». Для подтверждения этого диагноза образцы печени павших животных были проверены в ИФА на наличие антигена и в ОТ-ПЦР на наличие РНК вируса геморрагической болезни кроликов. Все исследованные образцы оказались положительными.

Известно, что в России циркулирует первый генотип ВГБК, но по сообщениям сотрудников ФГБНУ ФИЦВИМ, отмечены случаи выявления вирусов геногруппы GI2 [8]. Для определения генотипа обнаруженного нами вируса было решено определить и проанализировать нуклеотидную последовательность наработанного в ПЦР фрагмента генома вируса. В результате был определен участок генома длиной 470 пар оснований, содержащий 5-концевой участок гена VP1 и 3-концевой участок гена VP60.

Анализ полученного фрагмента генома программой BLAST показал, что наиболее близкими последовательностями к исследуемой являются последовательности

Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе фрагмента генома вирусов геморрагической болезни кроликов. Исследуемый вирус обозначен •
Fig. 1. Phylogenetic dendrogram based on a fragment of the genome of rabbit hemorrhagic disease viruses. The virus under study is designated •

Рис. 2. Выравненные аминокислотные последовательности белка VP60 ВГБК-2**Fig. 2.** Aligned amino acid sequences of VP60 protein VGBK-2

ВГБК второго генотипа. Для филогенетического анализа полученного фрагмента из базы данных GenBank были взяты последовательности геномов ВГБК 2-го генотипа, полученные в разных странах, а также последовательности геномов ВГБК 1, 3 и 4 в качестве внешней группы. Как видно по филогенетической дендрограмме, представленной на рисунке 1, исследуемый вирус относится ко второму генотипу ВГБК. Наиболее близкими к нему оказались последовательности вирусов из США, Франции и Польши, выделенные в период 2016–2020 годов.

Исследуемый вирус содержит замену А46Т (аланин на треонин в позиции 46). Данная мутация может влиять на конформацию белка, так как неполярная аминокислота меняется на полярную. Что, в свою очередь, может влиять на антигенную структуру вируса.

Проведенные нами исследования свидетельствуют об еще одном подтвержденном случае выявления виру-

са геморрагической болезни кроликов 2-го генотипа на территории РФ.

Учитывая высокую контагиозность данного заболевания и широкое распространение штаммов RHDV GI2 в европейских и других странах в настоящее время, не следует исключать новых вспышек болезни в нашей стране.

Основным средством специфической профилактики ВГБК в России являются инаktivированные тканевые вакцины на основе штаммов RHDV GI1, которые не в состоянии предотвращать патологию, вызванную штаммами 2-го генотипа. Единственным возможным вариантом противостоять распространению новых вариантов ВГБК и связанных с этим экономических и экологических потерь является применение вакцин, содержащих антигены обоих вариантов RHDV, как в приусадебных хозяйствах, так и в условиях промышленного кролиководства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Camarda A. et al. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Res. Vet. Sci.* 2014. 97, 642–645.
2. Le Gall-Recule G. et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec.* 2011. 168:137–138.
3. Le Pendu et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *Journal of General Virology* 2017;98:1658–1666.
4. Mahar J.E. et al. Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 (RHDV2; GI.2) Is Replacing Endemic Strains of RHDV in the Australian Landscape within 18 Months of Its Arrival. *J Virol.* 2018

Jan 2;92(2):e01374–17.

5. OIE. Rabbit Haemorrhagic Disease, USA. (accessed on 27 August 2020); Available online: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=34728.
6. Pawlikowska M. et al. 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. 54:129–133
7. Puggioni G. et al. The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHDlike disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet Res.* 2013. 7(44):96.
8. <https://ficvim.ru/2019/02/tretij-sluchaj-obnaruzheniya-virusa-gemorrachicheskoy-bolezni-krolikov-novogo-tipa-vgbk-2-v-rossijskoj-federacii/>

НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ •

Российские ученые нашли способ увеличить содержание йода в мясе кроликов, овец и кур

Сотрудники ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» нашли способ увеличить содержание йода в мясе птицы и животных, сообщила в рамках пресс-конференции в МИА «Россия сегодня» замдиректора по научно-инвестиционной и технологической деятельности института Елизавета Дунаева.

«В Крыму, как и во многих других регионах нашей страны, наблюдается нехватка йода. Этот микроэлемент необходим для эндокринной системы и принимает участие во многих процессах, которые происходят в организме человека, — сказала она. — В нашем институте были проведены совместные с учеными из Татарстана ис-

следования, в ходе которых корма для животных были специальным образом насыщены йодом. После употребления этого корма в пищу мясо кур, кроликов и овец показало высокое содержание данного микроэлемента». Употребление таких продуктов в пищу позволяет получать необходимый объем йода более естественным способом, чем в таблетках, отметила ученый. По ее мнению, данная разработка может быть интересна сельхозпредприятиям Крыма, а также другим регионам РФ, стремящимся производить экологически чистые и полезные продукты.

Елизавета Дунаева пояснила, что включать необходимые микроэлементы в растения и корма и, опосредованно, в мясо животных и птиц позволяют липосомальные технологии, изучение которых является одним из направлений исследований ФГБУН НИИ сельского хозяйства Крыма.