

УДК: 577.2:578.828.6

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.1.25

ДИЗАЙН И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО МУЛЬТИЭПИТОПНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА АРТРИТА-ЭНЦЕФАЛИТА КОЗ

Хаммадов Н.И.^{1,2*} – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5669-1486); Галеева А.Г.^{1,2} – канд. ветеринар. наук, ст. науч. сотр., зав. лаб. вирусных антропоознозов (ORCID 0000-0003-2650-6459); Горбунова М.Е.¹ – канд. биол. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0707-2117); Сальманова Г.Р.¹ – аспирант (ORCID 0000-0003-2356-133X); Громова Е.А.¹ – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0416-6193); Хамидуллина А.И.² – студ. 5 курса факультета ветеринарной медицины (ORCID 0000-0001-5593-2399); Ефимова М.А.^{1,2} – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-8786-1310)

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности»

² ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана»

* nikhammadov@mail.ru

Ключевые слова: мелкий рогатый скот, вирус артрита-энцефалита коз (ВАЭК), рекомбинантный антиген, эпитоп, иммуноферментный анализ (ИФА).

Keywords: small cattle, caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), recombinant antigen, epitope, enzyme immunoassay (ELISA).

Поступила: 20.11.2024

Принята к публикации: 06.03.2025

Опубликована онлайн: 26.03.2025



РЕФЕРАТ

На сегодняшний день к единственному эффективному средству борьбы с вирусом артрита-энцефалита коз (ВАЭК) относят его раннюю диагностику и убой всех животных в неблагополучных и подозреваемых в неблагополучии хозяйствах, поскольку специфические меры профилактики не разработаны. Из широкодоступных средств для диагностических исследований можно выделить ПЦР индикацию генома ВАЭК и выявление специфических антител вируса, которое напрямую зависит от серологической активности и специфичности применяемых в диагностических наборах антигенов. Настоящая работа посвящена разработке рекомбинантного антигена для серологической индикации антител против ВАЭК. В результате биоинформационного анализа был выполнен поиск аминокислотных последовательностей белков вируса, анализ иммуногенных эпитопов данных белков, поиск сайтов N-, O- гликозилирования, сайтов сигнального пептида и трансмембранных доменов. На основе полученных данных произведен дизайн рекомбинантного мультиэпитопного антигена со следующей аминокислотной последовательностью «mqktnepyedfaarlleaidaeripvgaeiipesmkyrlgaksqgklneeaerwrnnppppavraytygvienpenyavkcq

plvqiyrstlptyqhhhhh». Сконструированная аминокислотная последовательность после перевода ее в нуклеотидную с учётом кодонной оптимизации продуцирования белка в *Escherichia coli*, клонирована в состав экспрессирующей конструкции на основе вектора pET28a (+). В результате конструирования длина созданной плазмиды для экспрессии нуклеотидной последовательности ВАЭК составила 5527 п.н. Нарботанный и очищенный методом аффинной хроматографии белок, содержащий в своём составе аминокислотные последовательности иммуногенных эпитопов антигенов ВАЭК, подтвердил свою функциональность в непрямом твердофазном иммуноферментном анализе с применением сывороток крови коз с подтверждённым ранее иммунным статусом к данному вирусу. Представленный в настоящей работе рекомбинантный мультиэпитопный антиген может найти широкое применение в качестве составляющего компонента при разработки диагностических тест-систем.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Артрит-энцефалит коз (АЭК) – персистирующее инфекционное заболевание коз, вызываемое лентивирусом, принадлежащим к семейству *Retroviridae*. К вирусу артрита-энцефалита коз (ВАЭК) восприимчивы домашние козы, есть данные об заражении овец [1] и крупного рогатого скота [2]. Болезнь характеризуется длительным бессимптомным вирусносительством, с последующим развитием клинических признаков поражения молочной железы, суставов, органов дыхания и центральной нервной системы [3]. На сегодняшний день к единственному эффективному средству борьбы с ВАЭК относят его раннюю диагностику и убой всех животных в неблагополучных и подозреваемых в неблагополучии хозяйствах, поскольку специфические меры профилактики не разработаны [4]. Есть данные и о другом подходе, который основан на отлучении новорожденных козлят до приема ими молозива матери, инфицированной ВАЭК, и раздельного содержания от общего стада с кормлением пастеризованным молоком [4].

Приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации № 565 от 25.09.2020 г. АЭК внесен в список особоопасных болезней животных, к которым также относят, например, такие инфекции как бруцеллез [5], сибирская язва [6], бешенство [7], африканская чума свиней [8]. Несмотря на это, официальное признание наличия АЭК в России зарегистрировано лишь с 2022 года, по данным Россельхознадзора было зафиксировано 2 новых неблагополучных пункта по данно-

му заболеванию и выявлено 14 новых случаев заболеваний коз. К тому же до 2022 года регулярно отмечались случаи и другой ретровирусной инфекции мелкого рогатого скота – вируса Висна-Маеди. По данным В.Ю. Коптева при серологическом исследовании проб сывороток крови от 1077 коз, содержащихся в личных подсобных и крестьянских фермерских хозяйствах, расположенных в 8 федеральных округах Российской Федерации, установлено, что в 27 регионах наблюдается распространение ВАЭК. Наибольшее количество серопозитивных по АЭК животных зафиксировано среди исследуемого поголовья коз, содержащихся в Дальневосточном (92,3%), Приволжском (53,3%), Сибирском (54,8%) и Уральском (56,62%) федеральных округах [3]. В двух хозяйствах Республики Татарстан за 2022 г выявлено 24 положительные пробы на АЭК, так же у некоторых коз был выражен артрит суставов, шаткость походки [9].

Диагностические исследования на АЭК в Российской Федерации осуществляются серологическими (реакция диффузионной преципитации в геле (РДП) и иммуноферментный анализ (ИФА)) и молекулярно-генетическим (полимеразная-цепная реакция в режиме реального времени – ПЦР-РВ) методами. Диагностика АЭК по клиническим и патоморфологическим признакам хоть и является специфической, но не выявляет большое число латентных носителей [10]. В связи с отсутствием в Российской Федерации нормативно-методических документов, на которые должна опираться

система диагностических мероприятий при выявлении АЭК, лаборатории при проведении исследований как правило используют ПЦР и ИФА тест-системы, доступные на коммерческом рынке страны. Метод ПЦР-РВ позволяет обнаруживать геном ВАЭК в пробах крови инфицированных животных на начальных стадиях заболевания [9], однако ввиду короткой фазы вирусемии вируса, данный способ применяют как дополнительный, до наступления сероконверсии [4]. К тому же метод ПЦР не отражает состояние иммунной системы, что необходимо принимать во внимание при планировании оздоровительных мероприятий в хозяйстве [11]. Одним из эффективных методов выявления вирусоносительства у коз является контроль наличия специфичных антител, что в свою очередь зависит от серологической активности и специфичности применяемых в диагностических наборах антигенов [12]. Однако при использовании серологических тестов из-за поздней (1,5-2 месяца) постинфекционной сероконверсии, часть недавно инфицированных животных может быть серонегативна, что требует разработки новых подходов для выявления инфицированных животных [4]. Одним из перспективных направлений повышения чувствительности и специфичности серологических тестов является использование рекомбинантных антигенов - аналогов иммуногенных эпитопов, специфичных большинству известных циркулирующих штаммов. Технология получения рекомбинантных белков является основой в конструировании и создании диагностических тест-систем нового поколения для индикации многих инфекционных заболеваний, а подход, основанный на использовании генетически трансформированного штамма-продуцента, позволяет получать высокоочищенные стабильные препараты рекомбинантных антигенов возбудителя болезни [13].

Целью работы явился дизайн и получение рекомбинантного мультиэпитопного антигена вируса артрита-энцефалита коз, предназначенного для использования

в серологических тестах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Антиген. Поиск аминокислотных последовательностей белков gag protein и envelope (env) polyprotein ВАЭК, биоинформационный анализ эпитопов данных белков осуществляли с помощью ресурса «Immune Epitope Database». В качестве референтной последовательности использовали последовательность ВАЭК, сохраненную из базы данных GenBank - NC_001463.1. (Caprine arthritis-encephalitis virus, complete genome). Поиск сайтов N-, O- гликозилирования, сайтов сигнального пептида и трансмембранных доменов проводили с помощью on-line ресурсов NetNGlyc1.0, DictyOGlyc - 1.1, SignalP 5.0 и TMHMM2.0 соответственно (сайт CBS Prediction Servers <http://www.cbs.dtu.dk/services>). Перевод аминокислотной последовательности в нуклеотидную осуществляли в интернет-ресурсе «IDT». Вставку нуклеотидной последовательности, кодирующую белки gag protein и env protein ВАЭК, в составе плазмидного вектора pET28a(+) и олигонуклеотиды для ПЦР заказывали в ЗАО «Евроген» (Россия). Наличие генетической вставки в плазмиде, а также её нуклеотидная последовательность было подтверждено путём предоставления результата секвенирования по методу Сэнгера (выполнено в ЗАО «Евроген» (Москва)).

Для увеличения концентрации применяемого плазмидного вектора трансформировали им компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5α с помощью хлористого кальция, методом теплового шока, согласно протоколу F.M. Ausubel, 2003 [14]. Культуру трансформированных клеток, содержащих модифицированную плазмиду с встроенным геном, культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB (Lysogeny broth) с добавлением канамицина в рабочей концентрации 20 мкг/мл. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* осуществляли набором Miniprep (ЗАО «Евроген», Россия), согласно инструкции производителя. Концентрацию выделенной плазмиды измеряли с

помощью спектрофотометра UV5Nano (Mettler Toledo, США). Трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамма BL21(DE3) со следующим генотипом - F⁻, ompT, hsdSB (rB⁻, mB⁻), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, Cmr. проводили аналогично клеткам штамма *E. coli* DH5 α согласно протоколу F.M. Ausubel, 2003 [14]. После получения продуктов экспрессии и трансляции проводили металл-аффинную хроматографию антигенов с использованием сорбента с Ni²⁺-сефарозой. Концентрацию белка в препаратах антигена ВАЭК измеряли с помощью спектрофотометра UV5Nano (Mettler Toledo, США).

Сыворотка крови. В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) использовали сыворотку крови коз, не содержащую антител к ВАЭК, положительного контрольного образца (ПКО) – использовали сыворотку крови коз, с подтвержденным наличием антител к ВАЭК (ИФА с набором производства Idexx) с титром не менее чем 1:1024. Также в работе использовали сыворотки крови коз (n=32) в возрасте от года до четырех лет, для которых было подтверждено наличие/отсутствие антител к ВАЭК методом ИФА с использованием коммерческих наборов, согласно инструкции производителя, а также ранее дополнительно проведено исследование крови от тех же животных на наличие/отсутствие ДНК методом ПЦР [15].

Конъюгат. В качестве конъюгата антивидовых антител применяли коммерческий препарат антивидового иммунопероксидазного конъюгата против IgG козы («Sigma», США).

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили с использованием коммерческих тест-систем CAEV/MVV» IDEXX (Франция) и «MVD-Enferplex Goat/Sheep Multidisease Test» Enfer (Ирландия) согласно инструкции производителя и способа ИФА на основе сконструированного антигена.

После оптимизации всех параметров реакции была принята следующая схема непрямого варианта ИФА. Антиген разво-

(КББ) до концентрации 100 мкг/мл, сенсибилизировали им планшет (ВНИИ «Медиполимер», Россия) в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали 3 ч при 37 °С. Содержимое лунок удаляли и отмывали три раза фосфатно-буферным раствором (ФБР) с добавлением 0,5% Твин-20 (ФБР-Т). Для определения минимального титра противовирусных антител к ВАЭК сыворотки вносили в объеме 4 мкл в первые лунки планшета в разведении 1:25 на ФБР и титровали методом последовательных двукратных разведений (последнее разведение 1:3200). В процессе тестирования сывороток в одном разведении в качестве рабочего использовали разведение 1:25. Планшет с образцами инкубировали 1 ч при 37°C. Содержимое лунок удаляли и отмывали три раза фосфатно-буферным раствором (ФБР) с добавлением 0,5% Твин-20 (ФБР-Т). Во все лунки планшета вносили по 100 мкл антивидового конъюгата в разведении 1:20000 на ФБР и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Содержимое лунок удаляли и отмывали пять раз ФБР-Т. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл тетраметилбензидин гидрохлорида (ТМБ) и инкубировали в темном месте при комнатной температуре (22±2°C) в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку планшета по 50 мкл 0,5М серной кислоты. Учет результатов ИФА осуществляли на спектрофотометре Multiskan GO («ThermoFisher», США) при длине волны 450 нм. Анализ считали положительным, если коэффициент отношения оптической плотности (ОП) исследуемой сыворотки к ОП отрицательного образца больше или равен 2,2; сомнительным, если коэффициент отношения ОП исследуемой сыворотки к ОП отрицательному образцу от 2,0 до 2,2; отрицательным, если коэффициент отношения ОП исследуемой сыворотки к ОП отрицательному образцу меньше 2,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Геном ВАЭК (9.2 kb) представлен пятью генами *gag*, *pol*, *CaVgp3*, *CaVgp4* и *env*, которые кодируют белки *gag* protein (*CaVgp1*), *pol* protein (*CaVgp2*), *protein Q*

(CaVgp3), protein S (CaVgp4) и envelope polyprotein; trans-regulatory splicing-like protein (CaVgp5), соответственно. Для разработки рекомбинантного антигена с помощью биоинформационного анализа нами были отобраны наиболее иммуногенные для ВАЭК антигены, а именно gag

protein и envelope (env) polyprotein. Аминокислотные последовательности данных антигенов (относительно данных референтной последовательности вируса NC_001463.1) представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Аминокислотная последовательность иммунодоминантных антигенов

Антиген	Аминокислотная последовательность
gag protein	mvslrdmarqvsggkrdypelekeckihackikvrlrgehltegnclwclktldymfedh-keepwtkvkfrtiwqkvknltpesnkdkfmslqatlaglmccqmgmrpetlqdamatvimkdglleqeekkedkrekeesvfipivvqaaggrswkavdsvmfqqlqtvmqhlvsedferqlayattwtksdilevlammpgnraqkeliqgklnaeaerwrnppppagggltvdqimgvgqtnqaaaqanmdqarqiclwvinalravrhmahrpnpmlvkqktnepyedfaarlleidaepvtqpikdykltsyntasadqkqmdrtlgqrqqasveekmqacrdvsgsefkmqlaqlrpgkgkgngqpqrcyncgkpgghqarqcrqgiichncgkrghmqkecrgkrdirgkqqgngrrgirvpsappme
envelope (env) polyprotein	mdagarymrltgenwvevmdgekerkregft-agqqgkyqpqvskqignrntnpcfaykgiflwrsltmwillginmcvsaedyitlisdpypgfsipknvsgvpvtcvtkfakwgcqplgaypdpeieyrnsvqevvkevyqenwpwntyhwplwqmenvrywlkenmqenqqrknntkegieellagtirgrfcvpyfallkctkwcytaainnesgkagkikinctearavscetdmplasiqraywdekdrsmafmnikacdsnlrcqkrpggcmegypipvgaeiipesmkylrgaksqyggikdkngelklpltlrvwvklanvsevngrtpdwqdringskgingtlwgelnsmhhlqfalqngkwcnysgeiklqgetfyhykpnwnctgnwtqypvwqvimldmvehmtgecvqrpqrhntvngtitgncstnwdgcncsrsgnylnssegllilcrqnstlrlgtntnwtmwigykncsgcenatldntgegtlggvankncslphknesnkwctapqrqrdgktdslyiaggkkfwtrikaqfscsnigqldgmihqqillqkyqvikvraytygviempenyaktriinrkrelshkrkrkgvglvimlvimaivaagaslgvanaiqqsytkaaavqtlanaataaqdvleatyamvqhvakgvrilearvarveaitdrimlyqeldcwhyhqcitstktevakyinwtrfkdnctwqqwerglqgydntlltllkesaamtqlaeearripevveslkdvfdwsgwfwlkyipiivvgllgciliravicvcqplvqiyrstlptyqrvtvimetradvagenqdfgdgleesdnsetservtvqkawsrawelwqnsppwkepwwrgllrlvplmtmgiwingwlgehhknkkrkgdctwaked

В результате BLAST-анализа цельных антигенов gag protein и envelope (env) polyprotein установлено, что при анализе 100 наиболее гомологичных последовательностей уровень полиморфизма отобранных аминокислотных последовательностей у различных штаммов и изолятов вируса составляет от 81 и 58% соответственно, при анализе 1000 наиболее гомологичных последовательностей от 42 и 25%. Следует отметить, что специфичность обоих антигенов строго соответствует только лентивирусам мелкого рогатого скота. Также исследуемые аминокислотные последовательности были проанализированы на пептидном калькулято-

ре, для определения их физико-химических характеристик. По результатам пептидной калькуляции установлено, что молекулярная масса протеина gag, состоящего из 448 аминокислот - 50.7 кДа, коэффициент экстинкции $50070 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, изоэлектрическая точка достигается при pH = 9, при нейтральной pH суммарный заряд 14.9, протеин хорошо растворим в воде; молекулярная масса протеина env состоящего из 944 аминокислот - 107.86 кДа, коэффициент экстинкции $281930 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, изоэлектрическая точка достигается при pH = 8.34, при нейтральной pH суммарный заряд 19.3, протеин хорошо растворим в воде.

С использованием интернет-ресурса ТМНММ 2.0 установлено отсутствие трансмембранных доменов у антигена gag protein. Антиген envelope (env) polyprotein включал четыре трансмембранных домена: первый, локализованный в области 90 а.а. не характеризовался переходом последовательности из одного положения в другое; второй и третий в позиции 633-655 а.а. и 804-826 а.а. инициировали переход аминокислотной последовательности с наружной локализации во внутреннюю и ограничивали последовательность «naiqqsytkaaqvqlanataaqqdvleatyamvqhvakgvrilearvarveaidrimlyqeldcwwhyhqcitsktkevalkyinwtrfkdnctwqqwerglqgydntlltllkesaamtqlaeeqarripevweslkdvdwsgwfw», которая не может осуществлять лидирующую роль в формировании антител, т. к. локализована внутри вириона; третий и четвертый в позиции 804-826 а.а. и 906-925 а.а. осуществляли переход аминокислотной последовательности с внутренней локализации в наружную, также четвертый домен инициировал переход аминокислотной последовательности с наружной локализации во внутреннюю и ограничивали последовательность «hhknkkrkgdcetwaked» которая локализована внутри вириона. Таким образом аминокислотные последовательности с 1 по 632 а.а. и с 827 по 905 а.а. могут вносить больший вклад в формирование антител, и также, как и gag protein являются потенциальными маркерами для серологической индикации антител против ВАЭК. Сигнальных пептидов в исследуемых антигенах не выявлено, следовательно, в ходе сборки вириона клетками инфицированного организма данные антигены не выделяются во внеклеточную среду.

Для антигенов, синтезируемых в клетках эукариот так же важно иметь ввиду наличие в их аминокислотной последовательности сайтов гликозилирования. Результаты анализа показали, что gag protein обладает двумя потенциальными сайтами N-гликозилирования и 33 сайтами O-гликозилирования с низкой степенью вероятности исполнения. Антиген envelope (env) polyprotein напротив, оказался

богат на сайты N-гликозилирования в совокупности количество сайтов гликозилирования и потенциальных сайтов составило 27, однако он не содержал достоверных сайтов O-гликозилирования.

Дальнейшим ключевым этапом исследования являлся детальный анализ иммуногенных эпитопов антигенов gag protein и envelope (env) polyprotein. Аналогично первичному исследованию иммуногенности белков ВАЭК, ход анализа был направлен на поиск иммуногенных эпитопов, но в отличие от первичного анализа работа была посвящена детальному анализу Т- и В-клеточного иммунного ответа, вовлеченности в иммунных ответ главного комплекса гистосовместимости (последний в обоих антигенах не выявлен), распределению иммуногенных эпитопов в последовательности антигена и степени их консервативности.

Анализ иммуногенных эпитопов антигена gag protein позволил выявить пять иммуногенных эпитопов два из которых дублировались. Так последовательности иммуногенных эпитопов были следующими: gnraqkeliqgklneeaerwrrnppppra (1), kqktnepyedfaarlleidaе (2), kqqgngrrgirvpsappme (3). Детальный анализ вида иммунного ответа позволил установить, что различными исследователями удалось получить на указанные иммуногенные эпитопы десять случаев Т-клеточного иммунного ответа и семь случаев В-клеточного иммунного ответа. При этом все три антигена участвовали в формировании В-клеточного иммунного ответа у коз и овец, Т-клеточный иммунный ответ определен лишь относительно второго эпитопа у исследуемых коз. Вторым эпитопом во всех реакциях характеризовался 100% консервативностью.

Анализ иммуногенных эпитопов антигена envelope (env) polyprotein позволил выявить 24 иммуногенных эпитопа, на которые охарактеризовано 49 случаев иммунных ответов у коз и овец, характер иммунного ответа во всех случаях был В-клеточным. Последовательности иммуногенных эпитопов были следующими: qeldcwwhyhqcits (1), ctwqqwerelqgyd (2),

dvleatyamvqhvak (3), eaitdrimlyqe (4), aktriinrrkrels (5), dmpqsyiqnqekyk (6), hqqillqkyqvkv (7), iempenyaktriin (8), kvraytygviempenyaktriinrk (9), kvraytygvvdmpqsyiqnqekyk (10), kyqvkvraytygv (11), raytygviempeny (12), rkrrelshtrkr (13), rvraytygvidlpqsyekinlrk (14), rvraytygviempknyekvslnrk (15), ctwqqrwerlggyd (16), edyitlisdpygfspiknsvgvptcvtkefakw (17), efakwgcqplgaydpdeieyrnsvqevvkev (18), kesaamtqlaeearripevweslkdvfdwsgwfwlkyipiivvgllg (19), pipvgaeiipesmkylrgaksqyggikdkngelklpltl (20), vcqplvqiyrtilstptyqrvtimetradvagenqdfgdgleesdns (21), empenyaktriinrk (22), kvraytygvvempnsnyeqkdrkrd (23), rvraytygvidmpknyektnlrk (24).

В исходной последовательности антигена референтного штамма вируса (GenBank ID NC_001463.1), из-за множественного полиморфизма аминокислотного состава искомым иммуногенным эпитопом не удалось идентифицировать семь (6, 10, 13, 14, 15, 23 и 24), два имели единичные аминокислотные замены (16 и 22), восемь были частично идентичными (2, 3, 4, 12, 17, 19, 20 и 21), семь (1, 5, 7, 8, 9, 11 и 18) полностью идентичны аминокислотной последовательности референтного штамма вируса. Консервативность антигенов при этом составляла от 57 до 100%. Иммунный ответ так же был не однородным, так индекс иммунного ответа с доверительным интервалом 95% для эпитопа 17 составлял 0.67 (0.39:0.87), 18 – 0.17 (0.01:0.56), 20 – 1.00 (0.61:1.00), 7 – 1.00 (0.47:1.00), 11 – 0.50 (0.10:0.89), 9 – 1.00 (0.47:1.00), 10 – 1.00 (0.04:1.00), 14 – 0.17 (0.01:0.56), 24 – 0.50 (0.15:0.84), 12 – 1.00 (0.47:1.00), 8 – 1.00 (0.47:1.00), 22 – 0.00 (0.00:0.76), 5 – 1.00 (0.47:1.00), 13 – 1.00 (0.47:1.00), 3 – 0.57 (0.22:0.86), 4 – 0.57 (0.22:0.86), 1 – 1.00 (0.65:1.00), 2 – 1.00 (0.04:1.00) и 0.50 (0.15:0.84), 19 – 1.00 (0.04:1.00), 21 – 1.00 (0.04:1.00). При этом индекс = 1 соответствует наличию иммунного ответа во всех случаях, индекс = 0 указывает на отсутствие иммунного ответа.

Так как исследование ориентировано

на разработку способа выявления антител коз в ответ на инфицирование ВАЭК, то и целевым видом иммунного ответа является В-клеточный иммунный ответ. Соответственно все три иммуногенных эпитопа gag protein и все иммуногенные эпитопы envelope (env) polyprotein способствуют эффективному дизайну химерного антигена для выявления антител против ВАЭК. В результате анализа установлено, что gag protein не обладает ни трансмембранными доменами, ни сигнальными пептидами, ни сайтами гликозилирования, из значимых составляющих он содержал лишь три вышеуказанных иммуногенных эпитопа. Envelope (env) polyprotein напротив, характеризовался множественным иммуногенным эпитопом (как с внешней структурной организацией, так и с внутренней), сайтов N-гликозилирования и трансмембранными доменами, визуальное это можно представить так

«mdagarymrltgenwvevtdmgekerkregftagqgkyqpqvskqiggnrntnpcfaykgiflwrltmwillginmcvsaedytildspygfsplikNVSGvptcvtkefakwgcqplgaydpdeieyrNVsqevvkevypenwpwnthywplwqmenvrywlkenmqenqqrkNNTkegieellagtirgrfcvppfalkctkwcytaainnesgkagikiNCTearavscetdimplasiqraywdekdresmafmnikacdsnlrcqkrpggcmegypipvgaeiipesmkylrgaksqyggikdkngelklpltlrvwvklkNVSevwngtpdwqdriNGSkgiNGTlwgelnsmhlgfalsqngkwcNYTgeiklgqetfgyhykpnwNCTgNWTqypvwqvimldmvehmtgecvqrpqrhNITvgNGTlitgNCStnwdgncsrsgnylyNSSegllilcrqNSTlritgtntnwtmwigykncsgceNATldntgegtlggvankNCSlphknesnkwtcaprqrdgktdslyiaggkkfwtrikaqfscsnigqldgmlhqqillqkyqvkvraytygviempenyaktriinrkrelshkrkrkgvglmvlvimaivaagaslgvanaiqqsytkaaavqtlanaataaqqdvl eatyamvqhvakgvrilearvarveaitdrimlyqeldcwhyhqcitsktevakyiNWTrfkNCTwqqrwerlggydntiltillkesaamtqlaeearripevweslkdvfdwsgwfwlkyipiivvgllgcilravicvcqplvqiyrtilstptyqrvtimetradvagenqdfgdgleesdnssetservtvqkawsrawelwqnsppwkepwkrgllrlvlplmtgiwingwlgehhknkrkgdcetwaked». В последовательности аминокислот белка строчное, полужирное буквенное обозначение означает иммуногенные эпитопы, курси-

вом обозначены аминокислоты, указывающие на внутреннюю структурную организацию, организованную наличием в последовательности аминокислот трансмембранных доменов, прописное буквенное обозначение аминокислот в полужирном шрифте указывает на наличие сайтов N-гликозилирования.

Для эффективного выявления искомым антител необходимо чтобы в конструируемом антигене присутствовали все или некоторые иммуногенные эпитопы с наружной структурной организацией, минимальной вариабельностью и по возможности наличием сайтов гликозилирования (при получении антигена путём рекомбинантного синтеза в эукариотической системе экспрессии), так же важно сведение к минимуму цистеинов, во избежание проблем с пространственной организацией белка. При выборе оптимального способа получения антигена необходимо ориентироваться на сложность получения исходного материала, выделения, очистки и идентификации антигена, а также экономические затраты на его получение. На сегодняшний день существует несколько подходов для получения антигенов, например, такие как выделение нативных антигенов, получение синтетических пептидов, рекомбинантный синтез антигенов. В настоящей работе был использован способ на основе рекомбинантного синтеза антигенов. Следует отметить, что ключевое значение в рекомбинантном синтезе имеет плазмидный вектор, несущий последовательность ДНК (и все необходимые регуляторные элементы) для синтеза антигена. При получении плазмидного вектора важно чтобы полученная нуклеотидная последовательность правильно совпала с открытой рамкой считывания и обладала всеми регуляторными элементами, так же желательно добавить с «С» конца молекулы последовательность лиганда для аффинной хроматографии, и постараться не использовать последовательности в гетерологичных системах экспрессии без кодонной оптимизации. Самым экономически обоснованным подходом является полу-

чение пептидов в прокариотических системах экспрессии, хотя эукариотические системы экспрессии так же не лишены актуальности.

В рамках представленной работы использованы пять последовательностей иммуногенных эпитопов – две из gag protein (1 и 2) и три из envelope (env) polyprotein (9, 20 и 21) к которым добавлены с «С» конца молекулы последовательность лиганда для аффинной хроматографии, а именно шесть аминокислот гистидина. В результате изменения полученная конструкция имела соответствующую аминокислотную

последовательность:
«mqktnepyedfaarlleidaepipvgaeiipesmkylrg
aksqgklneeaerwrrnppppavraytygviempenya
kvcqpl

vqiyrstlptyqhhhhhh» со следующими физическими характеристиками: молекулярная масса 12036.29 g/mol, коэффициент экстинкции 14650 M⁻¹cm⁻¹, изоэлектрическая точка достигается при pH 6.73, суммарный заряд при pH 7 составил минус 0.5, протеин хорошо растворим в воде. Для получения реальной молекулы осуществляли перевод аминокислотной последовательности в нуклеотидную, с учётом кодонной оптимизации для продуцирования белка в *E. coli* и добавлением кодона для окончания синтеза. Конечная нуклеотидная последовательность для клонирования в экспрессирующий вектор pET28a(+), с разбивкой по триплетам была следующей «atg caa aag aca aac gag ccc tac gaa gat ttc gcc gcc cgt ttg ttg gaa gcc att gat gca gaa cct att ccc gtt ggt gcc gag atc atc cca gag tcc atg aag tac ttg cgt gga gca aag agt caa ggg aag tta aac gag gaa gca gaa cgc tgg cgt cgc aac aat ccg ccc cct cct gca gtc cgc gcg tac act tat ggg gtg att gag atg ccc gag aat tat gcc aag gtg tgt cag ccc ctg gta cag att tat cgt acc ctg agt aca cct acc tac caa cac cac cat cac cat cac taa». В результате конструирования длина созданной плазмиды для экспрессии нуклеотидной последовательности ВАЭК составила 5527 п.н.. Структура разработанной рекомбинантной плазмиды, представлена на рисунке 1.

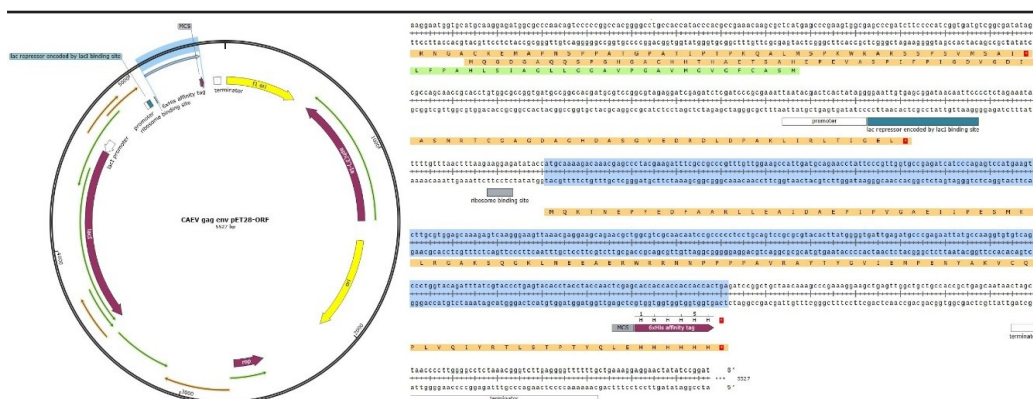


Рисунок 1 – Структура созданной рекомбинантной плазмиды.

Таблица 2 – Определение минимального титра антител к вирусу артрита-энцефалита коз при использовании способа ИФА на основе сконструированного антигена

Разведение	ОП сывороток крови коз $M \pm SD$	ОП ОКО $M \pm SD$	Коэффициент отношения значения оптической плотности образцов к ОКО
1:25	1,265±0,16	0,230±0,04	5,5
1:50	1,130±0,11	0,221±0,02	5,1
1:100	0,851±0,16	0,185±0,01	4,6
1:200	0,50±0,19	0,145±0,02	3,5
1:400	0,43±0,15	0,13±0,03	3,3
1:800	0,37±0,19	0,119±0,01	3,1
1:1600	0,18±0,14	0,078±0,02	2,4
1:3200	0,067±0,02	0,042±0,01	1,6

Таблица 3 – Оценка относительной чувствительности и специфичности способа ИФА на основе сконструированного мультиэпитопного антигена

Результаты набора «CAEV/MVV»	Результаты способа ИФА на основе сконструированного антигена		
	Положительные	Отрицательные	Всего
Положительные пробы	16/a	0/b	16/(a+b)
Отрицательные пробы	0/c	16/d	16/(c+d)
Всего проб	16	16	32

Примечания. *a* — истинно положительные результаты; *b* — ложноотрицательные результаты; *c* — ложноположительные результаты; *d* — истинно отрицательные результаты

Далее осуществляли наработку разработанной плазмиды следующим образом. В начале провели трансформацию плазмиды в клетки *E. coli*. Затем выполнили селекцию трансформированных бактериальных клеток по гену устойчивости к канамицину. После получения продуктов экспрессии и трансляции проводили атмосферную аффинную хроматографическую очистку антигенов (с применением никель-сефарозы в качестве сорбента). Концентрация белка в препаратах антигена ВАЭК составила 5,0 мг/мл. Далее полученный препарат был применен в разведении 100 мкг/мл, в качестве антигена, при проведении непрямого твердофазного ИФА для индикации антител против вируса артрита-энцефалита коз. При данной концентрации антигена оптическая плотность (ОП) ПКО составила 0,93, ОКО – 0,25, а коэффициент отношения ОП отрицательного и контрольного образцов был равным 3,72 ед.

Для определения минимального титра противовирусных антител к ВАЭК было проанализировано 16 положительных сывороток крови крупного рогатого скота, в трех повторях. Положительный статус данных образцов был подтвержден ранее методами ИФА и ПЦР. При определении анализируемого показателя каждый образец был разлит в разведении 1:3200. Результаты анализа представлены в таблице 2.

В результате эксперимента установлено, что минимальный титр антител к ВАЭК, выявляемый в исследуемых сыворотках крови с помощью ИФА, составляет 1:1600. Критерием того, что исследуемый образец считался положительным, являлся коэффициент отношения значений ОП исследуемого образца к ОКО равное или больше 2,2.

С помощью представленного способа ИФА на основе мультиэпитопного антигена и коммерческого набора «CAEV/MVV» IDEXX (Франция) провели исследование 32 сывороток крови коз, которые характеризовались как образцы от больных ВАЭК коз (n=16) и от коз свободных

от этого заболевания (n=16). Для оценки относительной специфичности и чувствительности проводили сравнение результатов, полученных с применением представленного в настоящей работе способа ИФА на основе сконструированного антигена и при использовании указанного выше коммерческого набора. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Относительную чувствительность (Se) рассчитывали по формуле:

$$a/(a + b) \times 100\%$$

Относительную специфичность (Sp) определяли по формуле:

$$c/(c + d) \times 100\%$$

Таким образом, относительная чувствительность и специфичность способа ИФА на основе сконструированного антигена составила 100%.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В результате анализа иммуногенных эпитопов белков gag protein и envelope (env) polyprotein ВАЭК выполнен дизайн рекомбинантного мультиэпитопного антигена со следующей аминокислотной последовательностью
«mqktnepyedfaarlleidaepipvgaeiipesmkylrg
aksqgklnceerwrtnppppavraytygviempenya
kvcqp

lvqiyrstltpyqhnhhhh». Разработанный антиген характеризовался оптимальными физико-химическими показателями (растворимость, коэффициент экстинкции, расчётные значения pH и изоэлектрической точки молекулы).

Сконструированная аминокислотная последовательность после перевода ее в нуклеотидную и оптимизации для продуцирования белка в *E. coli*, клонирована в состав экспрессирующей конструкции на основе вектора pET28a(+). В результате конструирования длина созданной плазмиды для экспрессии нуклеотидной последовательности ВАЭК составила 5527 п.н. Установлено, что рекомбинантный антиген ВАЭК может быть наработан в культурах бактериального штамма-продуцента и очищен методом аффинной хроматографии. По результатам исследо-

вания 32 пробы сывороток крови коз (16 – отрицательных, 16 – положительных) выявлено, что полученный антиген для индикации антител против ВАЭК специфически реагировал с сыворотками от инфицированных животных, минимальный титр антител к возбудителю, выявляемый в сыворотках крови составил 1:1600. Представленный в настоящей работе рекомбинантный мультиэпитопный антиген может найти широкое применение в качестве составляющего компонента при разработки диагностических тест-систем.

DESIGN AND PREPARATION OF A RECOMBINANT MULTIEPITOPE ANTIGEN FOR THE INDICATION OF ANTIBODIES AGAINST THE CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS

Khammadov N.I.^{1,2} – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5669-1486), **Galeeva A.G.**^{1,2} – Candidate of Veterinary Sciences, Senior researcher, head of the Lab of Viral Antropozoonoses (ORCID 0000-0003-2650-6459), **Gorbunova M.E.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Researcher, (ORCID 0000-0002-0707-2117), **Salmanova G.R.**¹ – postgraduate student (ORCID 0000-0003-2356-133X), **Gromova E.A.**¹ – Candidate of Biological Sciences, Senior researcher (ORCID 0000-0002-0416-6193), **Khamidullina A.I.**² – 5th year student of the Faculty of Veterinary Medicine (ORCID 0000-0001-5593-2399), **Efimova M.A.**^{1,2} – Doctor of Biological Sciences, leading researcher (ORCID: 0000-0001-8786-1310)

¹FSBSI «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety»

²FSBEI HE «Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman»

* nikhammadov@mail.ru

ABSTRACT

To date, the only effective means of combating goat arthritis-encephalitis viruses (CAEV) includes its early diagnosis and slaughter of all animals in dysfunctional and suspected farms, since specific preventive

measures have not been developed. Among the widely available tools for diagnostic studies, PCR indication of the CAEV genome and the detection of specific antibodies of the virus can be distinguished, which directly depends on the serological activity and specificity of the antigens used in diagnostic kits. This work is devoted to the development of a recombinant antigen for serological indication of antibodies against CAEV. As a result of bioinformatic analysis, a search was performed for amino acid sequences of virus proteins, an analysis of immunogenic epitopes of these proteins, a search for N-, O-glycosylation sites, signal peptide sites and transmembrane domains. Based on the data obtained, a recombinant multiepitope antigen was designed with the following amino acid sequence "mqktnepyedfaarlleidaepipvgaeiipesmkylrg aksqgklneeaerwrnnppppavraytygvienpenya kvcqplvqiyrstltpyqhnhhhh". The constructed amino acid sequence, after converting it to a nucleotide one, taking into account the codon optimization of protein production in *Escherichia coli*, was cloned into an expression construct based on the pET28a(+) vector. As a result of the design, the length of the created plasmid for the expression of the nucleotide sequence of the CAEV was 5527 bp. The protein developed and purified by affinity chromatography, containing amino acid sequences of immunogenic epitopes of the CAEV antigens, confirmed its functionality in indirect solid-phase enzyme immunoassay using blood sera from goats with previously confirmed immune status to this virus. The recombinant multiepitope antigen presented in this paper can be widely used as an integral component in the development of diagnostic test systems.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Larruskain A., Jugo B. Retroviral infections in sheep and goats: small ruminant lentiviruses and host interaction. *Viruses*. 2013; 5(8):2043-2061.
2. Стрижаков А.А., Цыбанов С.Ж., Чичикин А.Ю., Юрков С.Г., Волкова И.Ю., Жигалева О.Н., Бурдинский В.Г., Живодёров С.П. Заболевание телят, ассоцииро-

- ванное с вирусом артрита-энцефалита коз. Ветеринария. 2005; 8:21-22.
3. Коптев В.Ю., Шкиль Н.А., Балыбина Н.Ю., Пенькова И.Н. Выявление серопозитивных по артриту-энцефалиту коз на территории субъектов Российской Федерации. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2022; 9 (215):60-65. doi 10.53083/1996-4277-2022-215-9-60-65.
4. Покровская Е.С., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Елизарова И.А., Фаизов Т.Х. Антигенные кластеры трансмембранных и капсидных белков вируса артрита-энцефалита коз и их биоинформационный анализ. Ветеринарный врач. 2015; 6:6-22.
5. Громова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Осянин К.А. Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза. Ветеринарный врач. 2024; 3:34-40. doi 10.33632/1998-698X_2024_3_34.
6. Анисимова Е.А., Фахрутдинов Н.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Зайнуллин Л.И., Осянин К.А. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022; 26(6):560-567. doi 10.18699/VJGB-22-68.
7. Ахмадеев Р.М., Арсланова А.Ф., Алеева З.З., Яруллина Г.М., Арутюнян Г.С. Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства животных в Республике Татарстан. Ветеринарный врач. 2021; 6:11-19. doi 10.33632/1998-698X.2021-6-11-20.
8. Галеева А.Г., Ефимова М.А., Закирова Е.Ю., Хаммадов Н.И. Хисамутдинов А.Г., Гарипов Л.Н., Мингалеев Д.Н., Равилов Р.Х. Оптимизация протокола сборки рекомбинантных аденоассоциированных вирусов 2 серотипа для доставки генов вируса африканской чумы свиней в клетки млекопитающих. Международный вестник ветеринарии. 2024; 1:22-31. doi 10.52419/issn2072-2419.2024.1.22.
9. Сафина Р.Ф., Сальманова Г.Р., Усольцев К.В., Хаммадов Н.И., Фаизов Т.Х. Встречаемость ретровирусов животных в районах Республики Татарстан. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2022; 249(1):183-188. doi 10.31588/2413_4201_1883_1_249_183.
10. Коптев В.Ю., Шкиль Н.А., Балыбина Н.Ю., Пенькова И.Н. Клинические признаки и патоморфологические изменения при артрите-энцефалите коз. Ветеринария сегодня. 2023; 12(2):126-132. doi 10.29326/2304-196X-2023-12-2-126-132.
11. Пенькова, И.Н., Балыбина Н.Ю., Коптев В.Ю. Выявление серопозитивных по артриту-энцефалиту коз животных на территории Сибирского федерального округа. Аграрная наука - сельскому хозяйству : Сборник материалов XVII Международной научно-практической конференции. В 2-х книгах, Барнаул, 09–10 февраля 2022 года. Том Книга 2. – Барнаул: Алтайский государственный аграрный университет, 2022; 202-203.
12. Горбунова М.Е., Усольцев К.В., Шангараев Р.И., Громова Е.А., Хаертынов К.С., Галеева А.Г. Очистка антигенов вируса лейкоза крупного рогатого скота методом ультрацентрифугирования. Ветеринарный врач. 2024; 2:43-48. doi 10.33632/1998-698X_2024_2_43.
13. Шустов А.В., Ескендирова С.З., Манат Е., Унышева Г.Б., Сарина Н.И. Получение рекомбинантного антигена бруцелл -Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы (SOD). Биотехнология. Теория и практика. 2013; 3:65-70.
14. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology [https \[Electronic resource\]. Available at: //hoclai.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/current-protocols-in-molecular-biology.pdf](https://www.hoclai.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/current-protocols-in-molecular-biology.pdf) (дата обращения 05.08.2024).
15. Лукманова Г.Р. Индикация вируса артрита-энцефалита коз в ПЦР-РВ и поиск генетических маркеров. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020; 242(2):97-101. doi 10.31588/2413-4201-1883-242-2-97-101.

REFERENCES

1. Larruskain A., Jugo B. Retroviral infections in sheep and goats: small ruminant lentiviruses and host interaction. *Viruses*. 2013; 5(8):2043-2061.
2. Strizhakov A.A., Tsybanov S.Zh., Chichikin A.Yu., Yurkov S.G., Volkova I.Yu., Zhigaleva O.N., Burdinskiy V.G., Zhivoderov S.P. The disease of calves associated with virus of arthritis and encephalitis of goats. *Veterinary medicine*. 2005; 8:21-22. (In Russ.)
3. Koptev V.Yu., Schkiel N.A., Balybina N.Yu., Penkova I.N. Identification of seropositive caprine arthritis-encephalitis goats in the territorial entities of the Russian Federation. *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2022; 9(215):60-65.
4. Pokrovskaya E.S., Shuralev E.A., Mukminov M.N., Elizarova I.A., Faizov T.Kh. Antigenic clusters of transmembrane and capsid proteins of caprine arthritis encephalitis virus and their bioinformatic analysis. *The Veterinarian*. 2015; 6:6-22. (In Russ.)
5. Gromova E.A., Mirkhazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Osyanin K.A. Development of a multiplex RT-PCR test system for detecting the causative agent of brucellosis. *The Veterinarian*. 2024; 3:34-40.
6. Anisimova E.A., Fakhrutdinov N.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Khammadoev N.I., Zainullin L.I., Osyanin K.A. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2022;26(6):560-567. doi 10.18699/VJGB-22-68. (In Russ.)
7. Akhmadeev R.M., Arslanova A.F., Aleeva Z.Z., Yarullina G.M., Arutyunyan G.S. Epizootic situation and prevention of animal rabies in the Republic of Tatarstan. *The Veterinarian*. 2021; 6:11-19.
8. Galeeva A.G., Efimova M.A., Zakirova E.Yu., Khammadoev N.I., Khisamutdinov A.G., Garipov L.N., Mingaleev D.N., Ravi-
lov R.H. Optimization of the protocol for the assembly of recombinant adenoas-sociated serotype 2 viruses for the delivery of african swine fever virus genes into mammalian cells. *International bulletin of Veterinary Medicine*. 2024; 1:22-31. doi 10.52419/issn2072-2419.2024.1.22. (In Russ.)
9. Safina R.F., Salmanova G.R., Usoltsev K.V., Khammadoev N.I., Faizov T.Kh. Incidence of animal retroviruses in areas of the Republic of Tatarstan. *Scientific Notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2022; 249(1):183-188. doi 10.31588/2413_4201_1883_1_249_183. (In Russ.)
10. Koptev V.Yu., Shkil N.A., Balybina N.Yu., Penkova I.N. Clinical signs of caprine arthritis-encephalitis and disease-related pathomorphological changes. *Veterinary science today*. 2023; 12(2):126-132.
11. Penkova, I.N., Balybina N.Yu., Koptev V.Yu. Identification of seropositive for arthritis-encephalitis of goat animals on the territory of the Siberian Federal District. *Agrarian science - agriculture : A collection of materials of the XVII International Scientific and Practical Conference*. In 2 books, Barnaul, February 09-10, 2022. Volume 2. Barnaul: Altai State Agrarian University, 2022; 202-203. (In Russ.)
12. Gorbunova M.E., Usoltsev K.V., Shangaraev R.I., Gromova E.A., Khaertynov K.S., Galeeva A.G. Purification of bovine leukemia virus antigens by ultracentrifugation. *The Veterinarian*. 2024; 2:43-48. doi 10.33632/1998-698X_2024_2_43. (In Russ.)
13. Shustov A.V., Eskendirova S.Z., Manat E., Unysheva G.B., Sarina N.I. Preparation of recombinant brucella-Cu/Zn-dependent superoxide dismutase (SOD) antigen. *Biotechnology. Theory and practice*. 2013; 3:65-70. (In Russ.)
14. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology* <https://www.hoclai.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/current-protocols-in-molecular-biology.pdf> [Electronic resource]. Available at: [//hoclai.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/current-protocols-in-molecular-biology.pdf](https://www.hoclai.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/current-protocols-in-molecular-biology.pdf) (accessed 05.08.2024)
15. Lukmanova G.R. Indication of the goat arthritis-encephalitis virus in PCR-RV and search for genetic markers. *Scientific Notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2020; 242(2):97-101.