

## ЛИХОРАДКА ЗАПАДНОГО НИЛА

---

### РЕЗЮМЕ

*Лихорадка Западного Нила это вирусное заболевание, переносимое комарами, которое может поражать птиц, людей и лошадей, вызывая бессимптомную инфекцию, лихорадочное состояние средней степени, менингит, энцефалит или смерть. Вирус Западного Нила является членом рода Флавивирусов семейства Flavaviridae. Арбовирус сохраняется в природе, циркулируя с птицами и комарами: многочисленные виды птиц и комаров содействуют репликации вируса. У множества видов птиц инфекция вирусом Западного Нила не вызывает выраженных признаков, в то время как у таких птиц, как американские вороны (*Corvus brachyrhynchos*) и голубые сойки (*Cyanocitta cristata*) инфицирование часто приводит к фатальному системному заболеванию. Среди млекопитающих клиническая болезнь в основном проявляется у лошадей и человека.*

*Клинические признаки инфекции вирусом Западного Нила у лошадей возникают в результате энцефалита или энцефаломиелита, вызываемого вирусом. Инфекции обусловлены передачей комарами и являются сезонными в умеренном климате. В северном полушарии пик приходится на раннюю осень. Пораженные лошади часто демонстрируют атаксию от средней до высокой степени тяжести. Признаки могут варьировать от легкого нарушения координации до лежачего положения. Некоторые лошади демонстрируют слабость, мышечную фасцикуляцию и нарушение черепно-мозговых нервов. Лихорадка не является неизменным признаком заболевания у лошадей.*

**Идентификация возбудителя:** *Ткани птиц обычно содержат более высокие концентрации вируса, чем ткани лошадей. Мозг и позвоночник являются предпочтительными тканями при выделении вируса у лошадей. У птиц изоляты вируса можно выделить из почек, сердца, мозга, печени или кишечника. Культуры клеток (используя, например, почки кролика или клетки Vero) наиболее часто используются для выделения вируса. Вирус Западного Нила цитопатичен в восприимчивых культурах. Вирусная нуклеиновая кислота и вирусные антигены можно обнаружить в тканях инфицированных животных с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и иммуногистохимического анализа, соответственно.*

**Серологические тесты:** *Антитела можно выявить в сыворотке лошадей с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с захватом IgM (ИФА с захватом IgM), реакции торможения гемагглютинации (РТГА), ИФА с захватом IgG, реакции нейтрализации бляшкообразования (РНБО) или реакции вируснейтрализации (РВН). ИФА, РВН и РНБО это методы, наиболее часто использующиеся для выявления антител к вирусу Западного Нила в сыворотке крови птиц. В некоторых серологических исследованиях можно столкнуться с перекрестными реакциями антител с родственными флавивирусами, такими как вирус энцефалита Сен-Луи, вирус Усуту, вирус японского энцефалита или вирус клещевого энцефалита.*

**Требования к вакцинам:** *для применения у лошадей лицензирована вакцина против Западного Нила, инактивированная формалином, полученная из культуры ткани,*

векторная вакцина против лихорадки Западного Нила на основе живого вируса оспы канареек, ДНК вакцина против лихорадки Западного Нила и химерная вакцина.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Вирус Западного Нила – это зоонозный арбовирус, передаваемый комарами, принадлежащий роду *Flavivirus* семейства *Flaviridae* (Smithburn *et al.*, 1940). Род *Flavivirus* помимо прочих также включает вирус японского энцефалита (см. Главу 2.1.9. *Исследования биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*), вирус энцефалита Сен-Луи, вирус энцефалита долины Мюррей, вирус Усуту, вирус Кунджин (Burke & Monath, 2001). Вирус Западного Нила имеет широкое географическое распространение, которое охватывает части Европы, Азии, Африки, Австралии (вирус Кунджин), а также Северной, Центральной и Южной Америки. Считается, что перелетные птицы являются основной причиной распространения вируса, включая повторные заносы вируса Западного Нила из эндемичных зон в регионы, в которых возникают спорадические вспышки (Burke & Monath, 2001). Вирус Западного Нила сохраняется в цикле передачи комар – птица – комар, в то время как люди и лошади считаются тупиковыми хозяевами. Генетический анализ изолятов лихорадки Западного Нила разделяет штаммы на множество линий (Mackenzie *et al.*, 2009; Vazquez *et al.*, 2010). Изоляты линии 1 обнаруживаются в Северной и Центральной Африке, Израиле, Европе, Индии, Австралии (вирус Кунджин) и в Северной и Центральной Америке, а также в Колумбии и Аргентине в Южной Америке (Morales *et al.*, 2006). Штаммы линии 2 эндемичны в Центральной и Южной Африке и на Мадагаскаре, в центральной Африке циркулируют вирусы обеих линий (Berthet *et al.*, 1997; Burt *et al.*, 2002). Недавно циркуляция штаммов линии два была зарегистрирована в Венгрии (Bakonyi *et al.*, 2006), Австрии (Wodak *et al.*, 2011), России (Platonov *et al.*, 2011), Румынии (Sirbu *et al.*, 2011), Греции (Danis *et al.*, 2011) и Италии (Savini *et al.*, 2012). Несмотря на то, что недавние вспышки среди людей и лошадей были вызваны вирусами линии 1 или 2, штаммы каждой из линий могут стать причиной болезни у людей или животных.

Вирус Западного Нила был признан патогеном человека в Африке в первой половине 20-го века. Несмотря на то, что были описаны несколько эпидемий вируса лихорадки Западного Нила, энцефалит, как последствие инфекции человека вирусом Западного Нила, редко встречался до 1996 года, но с того времени вспышки энцефалита Западного Нила у людей регистрировались в Румынии, России, Северной Америке, Франции, Тунисе, Италии и Греции. В 1960-ых годах вирусный энцефалит Западного Нила у лошадей регистрировался в Египте и Франции (Panthier *et al.*, 1966; Schmidt & El Mansoury, 1963). С 1998 года вспышки вирусного энцефалита Западного Нила у лошадей регистрировались в Аргентине, Канаде, Франции, Израиле, Италии, Марокко, Испании и США. В 2011 г. вспышка энцефалита лошадей, вызванная вирусом Кунджин, линия 1 вируса лихорадки Западного Нила была зарегистрирована в Австралии (Frost *et al.*, 2012). Признаков заболевания среди людей или птиц, вызванных этим вирусом, отмечено не было.

Возникновение заболевания у людей и животных, параллельно с проводимым надзором за активностью вируса лихорадки Западного Нила, демонстрируют, что ареал распространения вируса значительно вырос, захватив Северную, Центральную и Южную Америки, а также Европу и страны средиземноморского бассейна.

Период инкубации энцефалита Западного Нила лошадей после передачи от комара составляет 3 – 15 дней. Кратковременная виремия с низкими титрами вируса предшествует клиническому проявлению болезни (Bunning *et al.*, 2002; Schmidt & El Mansoury, 1963). Вирусный энцефалит Западного Нила возникает лишь у небольшого

процента инфицированных лошадей; большинство инфицированных лошадей не демонстрируют клинических признаков (Ostlund *et al.*, 2000). Заболевание лошадей часто характеризуется атаксией средней или высокой степени тяжести. К тому же лошади демонстрируют слабость, мышечную фасцикуляцию и нарушения в черепно-мозговых нервах (Cantile *et al.*, 2000; Ostlund *et al.*, 2000; 2001; Snook *et al.*, 2001). Лихорадка не является неизменным признаком. Лечение поддерживающее, а признаки могут исчезнуть или развиться до возникновения лежачего положения. Процент смертности составляет приблизительно каждую третью из клинически пораженных лошадей. Дифференциальная диагностика у лошадей охватывает другие арбовирусные энцефалиты (напр. восточный, западный или Венесуэльский энцефаломиелит лошадей, японский энцефаломиелит), конский протозойный миелит (*Sarcocystis neurona*), герпесвирус лошадей-1, болезнь Борна и бешенство.

Большинство видов птиц могут инфицироваться вирусом лихорадки Западного Нила, клинические результаты инфекции различны. Вспышки смертельного неврологического заболевания регистрировались у домашних гусей в Израиле и Канаде и у множества местных и экзотических зоопарковых птиц при возникновении лихорадки Западного Нила в США (Austin *et al.*, 2004; Steele *et al.*, 2000). В Европе смертельное неврологическое заболевание регистрировалось у диких птиц (Zeller & Schuffenecker, 2004). Вирус лихорадки Западного Нила ассоциировался со спорадической болезнью у небольшого количества других видов, включая белок, бурундуков, летучих мышей, собак, кошек, белохвостых оленей, северных оленей, овец, альпак, аллигаторов и тюленей обыкновенных во время периодов интенсивной местной вирусной активности.

Была подтверждена передача вируса лихорадки Западного Нила у людей при переливании крови, пересадке органов и кормлении грудным молоком, но большинство человеческих инфекций возникают при естественной передаче от комаров. Также отмечались случаи внутрилабораторных инфекций (Campbell *et al.*, 2002). Работа в лаборатории должна проводиться в соответствующих условиях биозащиты и сдерживания (BSL), определяемых на основе анализа биорисков (см. Главу 1.1.4 Биозащита и биобезопасность в ветеринарной микробиологической лаборатории и виварии). Вакцин для людей не существует.

Вследствие возникновения бессимптомных инфекций вирусом лихорадки Западного Нила диагностические критерии должны включать комбинацию клинической оценки и лабораторных тестов.

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Таблица 2. Методы исследования, доступные для диагностики лихорадки Западного Нила и их назначение**

Метод	Назначение				
	Благополучие популяции по инфекции	Индивидуальное благополучие животного от инфекции до перемещения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация агента<sup>1</sup></b>					
Гнездовая ОТ-ПЦР	-	++	++	-	-

ОТ-ПЦР в реальном времени	-	++	++	-	-
Выделение в культуре ткани	-	++	++	-	-
<b>Выявление иммунного ответа</b>					
ИФА с захватом IgM	-	-	++	-	-
Реакция нейтрализации бляшкообразования	++	-	+	++	++
Реакция нейтрализации сыворотки	++	-	+	++	++
Имуногистохимия	-	-	+	-	

Объяснение: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод, но может потребоваться дополнительная валидация; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но затраты, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для этих целей. Несмотря на то, что все тесты, перечисленные в категории +++ или ++ прошли формальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что они широко использовались без получения сомнительных результатов, делает их пригодными. ПЦР = полимеразная цепная реакция; IgM – иммуноглобулин М; ИФА = иммуноферментный анализ.

## 1. Идентификация возбудителя

### 1.1. Культивирование *in vitro* и *in vivo*

Попытки выявить вирус от живых, клинически больных лошадей обычно не увенчиваются успехом по причине быстротекущей вирусемии. Пробы для выделения вируса включают мозг (особенно задний мозг и продолговатый мозг) и позвоночник лошадей, пораженных энцефалитом (Ostlund *et al.*, 2000; 2001); можно с успехом применять множество тканей птиц, включая мозг, сердце или печень (Steele *et al.*, 2000). Вирус лихорадки Западного Нила также можно выделить из комаров. В целом изоляты вируса легче получить из проб от птиц и в меньшей степени от комаров и лошадей.

Вирус может размножаться в восприимчивых культурах ткани, таких как почки кролика (RK-13) и клетках почек африканской зеленой мартышки (Vero), а также в куриных яйцах с развивающимися эмбрионами. Также можно применять первичное выделение в яйцах с развивающимися эмбрионами или в клеточных линиях *Aedes albopictus* (C6/36) с последующим пассированием в клетках млекопитающих. Может потребоваться более одного пассажа для получения цитопатического эффекта. Подтверждение изолятов вируса лихорадки Западного Нила проводится с помощью непрямого окрашивания флуоресцирующими антителами инфицированных культур или методов выявления нуклеиновой кислоты (см. ниже).

### 1.2. Молекулярные методы – выявление нуклеиновой кислоты

Несколько ПЦР методов были описаны для идентификации вируса лихорадки Западного Нила, и некоторые из них доступны в качестве коммерческих тест систем, включая ОТ-ПЦР в реальном времени, способную выявлять обе линии 1 и 2 вируса лихорадки Западного Нила (Eiden *et al.*, 2010). К тому же описана традиционная ОТ-ПЦР на основе геля, призванная выявлять линию 1 североамериканских штаммов (Johnson *et al.*, 2001). Оба анализа успешно применяются на пробах, отобранных в поле. Линия 1 вируса лихорадки Западного Нила из Франции, Египта, Израиля, Италии, Кении Мексики и России демонстрируют высоко консервативную нуклеотидную последовательность в

целевом регионе, независимо от вида происхождения (Lanciotti *et al.*, 2000). В то время, когда во избежание контаминации при гнездовом методе требуются строгие лабораторные практики, существует более высокая чувствительность выявления РНК североамериканских штаммов вируса лихорадки Западного Нила при помощи традиционной гнездовой процедуры, в частности в полевых пробах от лошадей. Эффективность традиционной ОТ-ПЦР при выявлении других линий вируса лихорадки Западного Нила неизвестна. В свете постоянной эволюции и возможного возникновения новых штаммов вируса лихорадки Западного Нила важно, чтобы протоколы ПЦР исследований находились под постоянным мониторингом и подвергались регулярной актуализации. Пробы, подходящие для ОТ-ПЦР на выявление вируса лихорадки Западного Нила, включают головной мозг млекопитающих и птиц, почки, сердце, печень, кишечник и пулы насекомых. При любом ПЦР исследовании обязательно включать положительные контроли и контроль без матрицы. В отношении гнездовой ОТ-ПЦР следует проявлять осторожность во избежание контаминации амплифицированным материалом во время переноса продукта внешнего праймера в гнездовые реакционные пробирки. Чтобы любая ПЦР была действительной, контрольные реакции должны попадать в ожидаемые пределы.

### **1.2.1. Экстрагирование вирусной РНК**

Несколько коммерческих тест систем доступны для экстрагирования РНК. Следует выбрать соответствующий набор для типа пробы и следовать рекомендациям производителя.

### **1.2.2. Гнездовая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией**

Описанная здесь гнездовая ОТ-ПЦР была разработана Eiden *et al.* (2010) для параллельной идентификации линии 1 и линии 2 вируса лихорадки Западного Нила. Идентификацию штамма можно провести секвенированием получившегося ампликона и выравниванием с эталонными штаммами вируса лихорадки Западного Нила. Процедура была немного изменена по сравнению с опубликованным методом, и здесь указаны праймеры и зонды, направленные на область генома вируса лихорадки Западного Нила. Анализ можно проводить с помощью коммерческого набора на выбор, который обеспечивает прогнозируемую амплификацию контролей. Циклические параметры должны быть скорректированы для соответствия требованиям к набору. Концентрации праймеров и зондов могут быть скорректированы для достижения оптимальных результатов. Внутренний контроль и соответствующие контрольные праймеры и зонд могут быть включены для подтверждения действительности экспериментальных условий.

Праймеры/зонд (область NS2A генома):

Прямой праймер: GGG-CCT-TCT-GGT-CGT-GTT-C

Обратный праймер: GAT-CTT-GGC-YGT-CCA-CCT-C

Зонд: FAM-CCA-CCC-AGG-AGG-TCC-TTC-GCA-A-BHQ

На пробу подготовить 20 мкл реагентов ОТ-ПЦР (в соответствии с инструкциями набора), содержащих 0,9 мкМ концентрацию каждого праймера и 0,25 концентрацию зонда. Распределить по 20 мкл смеси в каждую пробирку или лунку ПЦР с пробой. Добавить 5,0 мкл пробы экстрагированной РНК, запечатать пробирку/планшет и поместить в амплификатор. Прогнать пробы в условиях, описанных для используемого набора,

начиная с инкубации и последующими 45 циклами амплификации. Значения Ct равные 37 или менее считаются положительными на вирус лихорадки Западного Нила. Значения выше 42 являются отрицательными. Чтобы ПЦР была действительной, значения Ct положительных контролей должны попадать в предполагаемый диапазон.

### 1.2.3. Традиционная ПЦР с обратной транскрипцией

Описанный далее метод был разработан для выявления линии 1 вируса лихорадки Западного Нила (Johnson *et al.*, 2001). Процедура может проводиться как одноэтапная ОТ-ПЦР с использованием только внешних праймеров, или как гнездовой анализ. Гнездовой анализ является наиболее чувствительной ОТ-ПЦР и рекомендуется для исследования тканей головного мозга млекопитающих или других проб, которые могут содержать низкое количество вируса. Мишенью этой ОТ-ПЦР является область E генома вируса лихорадки Западного Нила. Анализ может проводиться с помощью коммерческой тест-системы на выбор, которая может обеспечить ожидаемую амплификацию контролей. Циклические параметры должны быть скорректированы для соответствия требованиям к набору.

Внешние праймеры:

1401F: ACC-AAC-TAC-TGT-GGA-GTC

1845R: TTC-CAT-CTT-CAC-TCT-ACA-CT

Гнездовые праймеры:

1485F: GCC-TTC-ATA-CAC-ACT-AAA-G

1732R: CCA-ATG-CTA-TCA-CAG-ACT

На пробу подготовить 45 мкл реагентов ОТ-ПЦР (в соответствии с инструкциями к набору), содержащих 0,6 мкМ концентрацию каждого внешнего праймера. Распределить по 45 мкл смеси в каждую пробирку ПЦР с пробой. Добавить 5,0 мкл пробы экстрагированной РНК и поместить в амплификатор. Прогнать пробы в условиях, описанных для используемого набора, начиная с инкубации и последующими 35 циклами амплификации. Для гнездовой реакции подготовить схожую реакционную смесь (без обратной транскриптазы) с 49 мкл на пробу, содержащую гнездовые праймеры и распределить в ПЦР пробирки. Перенести 1,0 мкл продукта амплификации внешнего праймера в гнездовую пробирку и поместить в амплификатор. Проявить осторожность при переносе продукта амплификации во избежание контаминации проб. Провести 35 циклов амплификации в соответствии с рекомендациями к набору. После амплификации смешать 8 – 10 мкл каждого ПЦР продукта с загрузочным буфером, содержащим ДНК краситель. Погрузить смесь в гель и исследовать с помощью электрофореза в агаровом геле, а затем рассмотреть в ультрафиолетовом свечении. Пробы, положительные на вирус лихорадки Западного Нила, можно идентифицировать как полосу в 445 пар оснований (амплификация только внешнего праймера) и/или полосу в 248 пар оснований (гнездовая амплификация). Чтобы ПЦР была действительной, положительные контроли должны иметь полосы ожидаемого размера, а контроли без матрицы не должны иметь полос. Ампликоны ПЦР могут быть подвергнуты секвенированию для подтверждения идентичности.

### 1.3. Выявление антигена – методы иммунного мечения

Иммуногистохимическое окрашивание тканей птиц, фиксированных в формалине, является надежным методом идентификации инфекции вирусом лихорадки Западного Нила у птиц. Головной мозг, сердце, почки, селезенка, печень, кишечник и легкие часто являются положительными тканями при иммуногистохимическом окрашивании у птиц. Коэффициент эффективности выявления с помощью иммуногистохимического окрашивания у положительных птиц повышается посредством исследования множества тканей. Специфичность идентификации (напр. флавивирус-специфичный или вирус лихорадки Западного Нила-специфичный) зависит от выбора детекторного антитела. Ткани головного или спинного мозга лошадей, пораженных вирусным энцефалитом лихорадки Западного Нила неустойчиво положительны при иммуногистохимическом окрашивании; множество случаев энцефалита лошадей демонстрируют ложноотрицательные результаты. Неидентификация антигена вируса лихорадки Западного Нила в центральной нервной системе лошадей не исключает инфекцию. Для получения подробной консультации, обратитесь в Справочные лаборатории МЭБ.

## **2. Серологические методы**

Антитела можно выявить в сыворотке лошадей с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с захватом IgM (ИФА с захватом IgM), реакции торможения гемагглютинации (РТГА), ИФА с захватом IgG, реакции нейтрализации бляшкообразования (РНБО) и реакции микронеutralизации вируса (PMH) (Beaty *et al.*, 1989; Hayes, 1989). ИФА с захватом IgM, описанный ниже, особенно полезен для выявления антител лошадей, вырабатываемых в результате недавнего естественного подвергания вирусу лихорадки Западного Нила. IgM антитела, специфичные вирусу Западного Нила лошадей, обычно выявляются с 7-10 дня до 1-2 месяцев после инфицирования. Большинство лошадей с энцефалитом Западного Нила демонстрируют положительные результаты в ИФА с захватом IgM в период, когда наблюдаются первые клинические признаки. Антитела, нейтрализующие вирус лихорадки Западного Нила, выявляются в сыворотке крови лошадей к 2 неделям после инфекции и могут сохраняться в ней более года. ИФА, РТГА, РВН и РНБО являются наиболее часто используемыми методами для идентификации антител к вирусу лихорадки Западного Нила в сыворотке крови птиц. В некоторых серологических исследованиях возникают перекрестные реакции антител с родственными флавивирусами, такими как вирус энцефалита Сен-Луи или вирус японского энцефалита. Реакция НБО – наиболее специфична среди серологических исследований на вирус лихорадки Западного Нила; при необходимости титры сывороточных антител к родственным флавивирусам можно исследовать параллельно. В итоге история вакцинации против лихорадки Западного Нила должна учитываться при интерпретации результатов серологии, в частности в реакции НБО и ИФА с захватом IgG. ИФА с захватом IgM можно применять для исследования птиц и других видов, при условии, что присутствует видоспецифическое захватывающее антитело (напр. антикуриный IgM). Реакция НБО применима ко всем видам, включая птиц.

### **2.1. ИФА и родственные методы**

#### **2.1.1. ИФА с захватом лошадиного IgM**

Вирус лихорадки Западного Нила и отрицательные контрольные антигены для ИФА с захватом IgM можно приготовить из мозга мышей (см. Главу 2.5.5 *Энцефаломиелит лошадей [Восточный и западный]*), культуры тканей или рекомбинантных клеточных

линий (Davis *et al.*, 2001). Коммерческие источники испытательных реагентов вируса лихорадки Западного Нила доступны в Северной Америке. Охарактеризованная контрольная лошадиная сыворотка крови, хоть и не являющаяся международным стандартом, может быть получена в Лаборатории национальной ветеринарной службы, Эймз, Айова, США. Вирус и отрицательные контрольные антигены должны быть приготовлены параллельно для применения в ИФА. Антигенные препараты должны подвергнуться титрованию с использованием контрольной сыворотки крови для оптимизации чувствительности и специфичности анализа. Пробы лошадиной сыворотки крови исследуются в разведении 1/400, а пробы лошадиной спинномозговой жидкости исследуются в разведении 1/2 в анализе. Для обеспечения специфичности каждая проба сыворотки крови исследуется на реактивность с использованием, как антигена вируса, так и контрольного антигена.

### 2.1.2. Процедура теста

- i) Покрывать плоскодонные 96-луночные ИФА планшеты антилошадиным IgM в дозе 100 мкл на лунку, разведенным в 0,5 М карбонатного буфера, pH 9,6 в соответствии с рекомендациями производителя по разведению для применения в качестве захватывающего антитела.
- ii) Инкубировать планшеты в течение ночи при 4 °C во влажной камере. Покрытые планшеты можно хранить в течение нескольких недель.
- iii) До применения дважды вымыть планшеты с 0,01 М физиологического раствора, забуференного фосфатом в дозе 200-300 мкл на лунку, pH 7,2, содержащим 0,05% Твин 20 (ФБРТ).
- iv) Блокировать планшеты, добавив 300 мкл на лунку свежеприготовленного 5% обезжиренного сухого молока в ФБРТ и инкубировать 60 минут при комнатной температуре. После инкубации удалить блокирующий раствор и вымыть планшеты трижды с ФБРТ.
- v) Тестируемые и контрольные сыворотки развести 1/400 (спинномозговая жидкость разводится 1/2) в ФБРТ, добавить по 50 мкл каждой пробы в лунки в двух повторностях (всего 4 лунки на пробу). Включить контрольную положительную и отрицательную сыворотку, приготовленную таким же образом, как и пробы.
- vi) Закрывать планшеты и инкубировать 75 минут при 37 °C во влажной камере.
- vii) Удалить сыворотку и трижды вымыть планшеты с ФБРТ.
- viii) Развести вирус и отрицательные контрольные антигены в ФБРТ и добавить 50 мкл вирусного антигена в один набор лунок на тестируемую и контрольную сыворотку и добавить 50 мкл нормального антигена во второй набор лунок для тестируемой и контрольной сыворотки.
- ix) Закрывать планшеты и инкубировать в течение ночи при 4 °C во влажной камере.
- x) Удалить антигены из лунок и трижды вымыть планшеты с ФБРТ.

- xi) Разбавить конъюгированное пероксидазой хрена моноклональное антитело<sup>1</sup> к Флавивирусу в соответствии с инструкциями производителя и добавить 50 мкл на лунку.
- xii) Закрыть планшеты и инкубировать 60 минут при 37 °С.
- xiii) Удалить конъюгат и вымыть планшеты шесть раз в ФБРТ.
- xiv) Добавить 50 мкл субстрата свежеприготовленной АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) с перекисью водорода (0,1%) и инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
- xv) Измерить поглощающую способность при 405 нм. Тестируемая проба считается положительной, если поглощающая способность тестируемой пробы в лунках, содержащих вирусный антиген, как минимум в два раза превышает поглощающую способность отрицательной контрольной сыворотки в лунках, содержащих вирусный антиген, и как минимум в два раза превышает поглощающую способность тестируемой пробы в параллельных лунках, содержащих контрольный антиген.

### **2.1.3. Непрямой или конкурентный ИФА**

Многочисленные непрямые и конкурентные коммерческие и внутренние ИФА методы были разработаны и используются для выявления антител к вирусу лихорадки Западного Нила. В то время как конкурентные методы применяются для исследования сыворотки всех видов животных, непрямые методы требуют видоспецифичных антител, меченых ферментом. Обоим видам ИФА не хватает специфичности, так как они перекрестно реагируют с антителами, направленными на другие флавивирусы, особенно те, которые принадлежат серогруппе японских энцефалитов. Они очень полезны для целей эпидемиологии и надзора, а также методов скрининга. Положительный ИФА результат, однако, должен быть подтвержден более специфичным исследованием, таким как РВН или реакцией НБО. Большинство непрямых или конкурентных ИФА выявляют антитела любого класса иммуноглобулина (IgM, IgG и т.д.). Вакцинированные лошади часто демонстрируют положительные результаты в непрямом и конкурентном ИФА.

## **2.2. Нейтрализация**

### **2.2.1. Реакция нейтрализации бляшкообразования (применима к сыворотке крови любых видов)**

Реакция НБО проводится на клеточной культуре Vero либо в 25 см<sup>2</sup> матрасах, либо в 6-луночных планшетах. Сыворотку крови можно исследовать в конечном разведении 1/10 и 1/100 или можно титровать для установления конечного состояния. Описание теста, проводимого в 25 см<sup>2</sup> матрасах с использованием 100 бляшкообразующих единиц (БОЕ) вируса, следующее.

До тестирования сыворотку инактивируют нагреванием при 56 °С в течение 30 минут и разводят (напр. 1/5 и 1/150) в среде. Рабочее разведение вируса (200 БОЕ на 0,1 мл) готовится в среде, содержащей 10% комплемент морской свинки. Равные объемы вируса

---

<sup>1</sup> Доступно в Центрах по контролю и профилактике болезней, биологические справочные реагенты, 1600 Clifton Road NE, Mail Stop C21, Атланта, Джорджия, 30333, США

и сыворотки смешивают и инкубируют при 37 °С в течение 75 минут до инокуляции 0,1 мл на конфлюэнтные монослои культуры клеток. Инокулум абсорбируют в течение часа при 37 °С, затем добавляют 4,0 мл первичной двухфазной среды. Первичная двухфазная среда состоит из двух растворов, которые готовят отдельно. Раствор I содержит 2 х основной солевой раствор Эрла без фенолового красного, 4% фетальную бычью сыворотку, 100 мкг/мл гентамицина и 0,45% бикарбоната натрия. Раствор II состоит из 2% Нобль-агара, который стерилизуют и хранят при 47 °С. Равные объемы растворов I и II доводят до 47 °С и смешивают непосредственно перед использованием. Тест инкубируют в течение 72 часов при 37 °С. Вторые 4 мл двухфазной среды готовят, как описано выше, но с содержанием 0,003% нейтрального красного в каждом матрасе. После инкубации в течение ночи при 37 °С оценивают количество вирусных бляшек на сосуд. Титры конечного состояния основываются на 90% снижении по сравнению с контрольными матрасами, которые должны иметь около 100 бляшек.

### **2.2.2. Реакция нейтрализации вируса – формат микропланшета**

Реакция микронейтрализации способна идентифицировать и определять количество антител к вирусу лихорадки Западного Нила, присутствующих в опытных образцах. Его проведение сравнимо с реакцией НБО, однако, она требует меньшего объема пробы, чем для РНБО и более пригодна, если доступны лишь небольшие объемы проб (Weingartl *et al.*, 2003). Надлежащие меры предосторожности требуются для профилактики подвигания человека вирусу при использовании живого вируса лихорадки Западного Нила в незапечатанных планшетах.

### **2.2.3. Процедура исследования**

Обычно используемая клеточная линия – клетки почек африканской зеленой мартышки (Vero). Проведение РВН требует 3 – 5 дней.

- i) Двадцать пять мкл нескольких разведений сыворотки, начиная от 1/5 до 1/640, добавляют в каждую лунку стерильных плоскодонных микропланшетов, и каждую смешивают с равным объемом 100 ТЦД<sub>50</sub> эталонного вируса лихорадки Западного Нила. Затем их инкубируют при 37°С в 5% СО<sub>2</sub>.
- ii) После одного часа инкубации, приблизительно 10<sup>4</sup> клеток Vero, добавляют в каждую лунку в объеме 50 мкл минимальной поддерживающей среды, содержащей антибиотики и после инкубации в течение 3 – 5 дней, считывают результаты с помощью инвертированного микроскопа.
- iii) Лункам присваивают баллы относительно наблюдаемого ЦПД. Проба считается положительной, если она демонстрирует более 90% нейтрализации ЦПД при самом низком разведении (1:10). Титры сыворотки представляют самое высокое разведение сыворотки, способное нейтрализовать более 90% ЦПД в культуре ткани.

Титр в РВН выше или равный 1/10 обычно считается специфичным для вируса лихорадки Западного Нила. Однако следует отметить, что птицы и млекопитающие могут демонстрировать перекрестные реакции на этом уровне после инфекции или вакцинации против вирусов японского энцефалита или энцефалита Сен-Луи.

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ**

## **1. Справка**

В 2003 году Министерство сельского хозяйства США (USDA) выдало лицензию на инактивированную формалином вакцину для лошадей против вируса Западного Нила, полученную на основе культуры ткани. Европейский Комитет по медицинским продуктам для ветеринарного использования (CVMP) утвердил этот продукт в 2008 году. В 2011 году продукт был условно лицензирован МСХ США для использования у аллигаторов. В 2004 году вакцина против вируса Западного Нила, полученная от инактивированной линии клеток человека получила регистрационное удостоверение в Израиле, как ветеринарная вакцина для гусей. Информация по биотехнологическим вакцинам также была лицензирована, как описано в разделе С.3 ниже. Эти вакцины продемонстрировали достаточную эффективность и у лошадей, вакцинированных надлежащим образом. Вакцинация может быть полезна при профилактике неврологических признаков, связанных с инфекцией вирусом Западного Нила.

Руководства по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, приведенные здесь и в Главе 1.1.8., являются общими по природе и могут дополняться национальными и региональными требованиями.

## **2. Описание производства и минимальные требования к вакцинам**

### **2.1. Характеристики посевного вируса**

См. Главу 1.1.8. для получения информации по общим требованиям к посевным вирусам и пассированию для производства вакцины.

#### **2.1.1. Биологические характеристики посевного вируса**

Изолят вируса лихорадки Западного Нила, используемый в качестве исходного посевного вируса для производства вакцин, должен сопровождаться документами, описывающими его происхождение и историю пассирования.

##### **i) Инактивированные вакцины**

Вирулентный вирус потенциально может быть использован в инактивированных вакцинах, при условии, что методы производства обеспечивают полную инактивацию исходного посевного вируса. Готовая вакцина должна быть безопасной для животных хозяев в возрасте, обозначенном для вакцинации, и обеспечивать защиту после контрольного заражения.

##### **ii) Живые вакцины**

Исходный посевной вирус должен быть безопасен для животных-хозяев в возрасте, предусмотренном для проведения вакцинации, и предоставлять защиту после введения. Его вирулентность не должна повышаться или подвергаться значительным генетическим изменениям при повторных пассированиях в животных хозяевах. В идеале исходный посевной вирус не должен выделяться от вакцинированных животных в окружающую среду, или выделение вируса должно быть минимальным и проходящим. Исходный

посевной вирус не должен негативно влиять на нецелевые виды, с которыми вакцинированное животное может вступать в контакт. Готовая вакцина должна обеспечивать защиту после контрольного заражения.

#### iii) Рекомбинантные вакцины

Рекомбинантные вакцины могут быть живыми или инактивированными, и рекомбинантные исходные посевные вирусы регулируются теми же требованиями, что и традиционные исходные посевные вирусы. К тому же рекомбинантные исходные посевные вирусы, экспрессирующие чужеродные гены, должны стабильно продуцировать чужеродные антигены.

#### iv) ДНК вакцины

Исходный посевной вирус представляет собой организм хозяин (напр. *Escherichia coli*), который экспрессирует плазмид, используемый в вакцине. Готовая ДНК вакцина регулируется теми же требованиями, что и перечисленные выше.

### **2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних примесей)**

Исходный посевной вирус должен исследоваться на чистоту, идентичность и свободу от посторонних примесей до того, как он будет использоваться для производства вакцины. Исходный посевной вирус должен быть свободен от бактерий, грибов и микоплазм. Он также должен быть свободен от посторонних вирусов, включая герпесвирус лошадей, аденовирус лошадей, вирус вирусного артериита лошадей, вирус вирусной диареи КРС, реовирус и вирус бешенства посредством метода флюоресцирующих антител. Исходный посевной вирус должен быть свободен от постороннего вируса, что подтверждается отсутствием ЦПД и гемадсорбции на клеточной линии Vero и эмбриональных клетках лошадей.

### **2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма**

При исследовании иммуногенности исходный посевной вирус на самом высоком уровне пассирования, предназначенном для производства, должен защищать восприимчивых лошадей от вирулентного изолята, используемого для контрольного заражения, обнаруженного в географической зоне, где предполагается применение вакцины. В идеале изолят для контрольного заражения и исходный посевной вирус должны быть гетерологичными. Исходные посевные вирусы, предназначенные для использования в живых вакцинах, также должны исследоваться на безвредность на восприимчивых нецелевых видах, таких как птицы.

### **2.1.4. Экстренная процедура для временной приемки нового исходного посевного вируса в случае эпизоотии**

В случае если возникающий штамм или вариант вируса лихорадки Западного Нила становится причиной чрезвычайной эпизоотической ситуации, которую невозможно контролировать вакцинами, существующими на данный момент, следует рассмотреть вариант временной приемки нового исходного посевного вируса, в идеале для использования в инактивированной вакцине. Такая приемка должна быть основана на результатах анализа риска потенциальной контаминации нового исходного посевного вируса посторонними агентами. Эта оценка риска должна

учитывать источник и историю пассирования исходного посевного вируса, а также характеристики процесса производства вакцины, включая природу и концентрацию инактиванта вируса.

## **2.2. Способ производства**

### **2.2.1. Процедура**

Исходный посевной вирус следует размножить в клеточных линиях, которые, как известно, могут поддерживать рост вируса лихорадки Западного Нила. См. Главу 1.1.8 для получения дополнительной информации по подготовке и исследованиям матровой расплодки клеток. Клеточные линии должны быть свободны от посторонних вирусов, бактерий, грибов и микоплазм. Размножение вируса не должно превышать пять пассажей начиная от исходного посевного вируса, если дальнейшие пассажи не доказывают свою эффективность при защите животного-хозяина.

Восприимчивую клеточную линию высевают в подходящие матрасы. Минимальная поддерживающая среда, обогащенная фетальной бычьей сывороткой (ФБС), используется в качестве среды для производства. Инкубация проводится при 37°C.

Клеточные культуры инокулируют напрямую с рабочим исходным вирусом Западного Нила, обычно на 1 – 4 пассаже от исходного посевного вируса. Инокулированные культуры инкубируют в течение 1 – 8 дней до сбора культурной среды. Во время инкубации культуры наблюдают ежедневно на наличие ЦПД и бактериальной контаминации.

Вакцины на основе убитого вируса химически инактивируют либо формалином, либо бинарным этиленимином и смешивают с подходящим адьювантом. Длительность инаktivации основана на демонстрируемой кинетике инаktivации.

Экспрессионную кассету ДНК вакцины амплифицируют в *E. coli* (или другой подходящий вектор). Очищенные плазмиды формулируют в вакцину.

### **2.2.2. Требования к ингредиентам**

Все ингредиенты, используемые в производстве вакцины против лихорадки Западного Нила, должны быть определены в утвержденных производственных протоколах и не должны меняться от партии к партии. См. Главу 1.18 в отношении общего руководства по ингредиентам животного происхождения. Ингредиенты животного происхождения должны происходить из страны с незначительным риском по трансмиссивным губкообразным энцефалопатиям (ТГЭ).

### **2.2.3. Контроль в процессе производства**

Производственные партии вируса Западного Нила следует титровать в культуре тканей для стандартизации продукта. Партии с низким титром можно концентрировать или смешать с партиями, имеющими более высокие титры для достижения правильного титра.

Партии инактивированного вируса лихорадки Западного Нила должны быть исследованы на полноту инактивации. Идеальные протоколы включают в себя этапы концентрации и амплификации для повышения уровня выявления остаточного живого вируса.

Производственные партии ДНК определяются количественно с помощью аналитических методов и характеризуются до стандартизации и смешивания при правильном содержании ДНК. Производственные партии не должны превышать самый высокий приемлемый уровень содержания липополисахаридов, основываясь на исследовании безопасности.

#### **2.2.4. Исследования партий готовых продуктов**

##### **i) Стерильность**

Образцы инактивированных и живых вакцин исследуют на контаминацию бактериями и грибами. Объем среды, используемой в этих исследованиях, должен быть достаточен для сведения к минимуму любых бактериостатических или фунгистатических воздействий консервантов в продукте. Для тестирования на наличие бактерий десять сосудов, каждый из которых содержит 120 мл казеин-соевой питательной среды, инокулируют 0,2 мл содержимого конечных контейнеров. Десять сосудов инкубируют при 30 - 35°C более 10 дней и наблюдают за ростом бактерий. Для тестирования на наличие грибов десять сосудов, каждый из которых содержит 40 мл казеин-соевой питательной среды, инокулируют 0,2 мл содержимого 10 конечных контейнеров. Сосуды инкубируют при 20 - 25°C в течение 14 дней и наблюдают за ростом грибов. Некоторые страны могут иметь другие требования.

##### **ii) Идентичность**

Отдельные исследования партий на идентичность следует проводить, если исследование иммуногенности партии, такое как например титрование живых вирусных вакцин на культуре ткани, не достаточно для проверки идентичности возбудителя в вакцине. Исследования на идентичность могут включать иммунофлюоресценцию или реакцию сывороточной нейтрализации.

К тому же, если процессы производства в режиме «пусто – занято» и обеззараживание не применяются, и в лаборатории размножают более одного возбудителя, исследования на идентичность должны демонстрировать, что никакой другой вакцинный штамм больше не присутствует.

##### **iii) Безопасность**

Тестирование на безопасность можно проводить в комбинации на морских свинках, мышах и животных хозяевах. Продукт следует вводить животным хозяевам в соответствии с инструкциями к препарату. Некоторые страны могут потребовать превышение дозы (напр. 2х – 10х). После вакцинации никаких системных или местных негативных реакций возникать не должно.

Возможно отступление от требования к исследованиям на безопасность партии *in vivo*, если безопасность продукта продемонстрирована и подтверждена в регистрационном досье, а производство соответствует всем требованиям,

описанным в Главе 1.1.8 и Главе 3.1.7. Минимальные требования к организации и управлению предприятием по производству вакцин).

#### **iv) Иммуногенность партии**

Для определения иммуногенности готовых вакцин на основе убитого вируса можно использовать вакцинацию животных-хозяев или лабораторных животных/серологические тесты или вакцинацию/контрольное заражение. Методы *in vitro* для сравнения стандарта с готовым продуктом также пригодны для определения относительной иммуногенности вакцины (МСХ США). Стандарт должен продемонстрировать свои защитные свойства в животном хозяине.

Живые вирусные продукты титруются в культурах клеток для определения иммуногенности конечного продукта. По сравнению с минимальной защитной дозой, установленной в исследовании на иммуногенность, титр иммуногенности партии на выходе, должен включать перерасход, учитывая вариабельность исследований партии и потерю иммуногенности с возрастом продукта. При отсутствии специфичных данных в поддержку рекомендуемые показатели составляют дополнительные  $0,7 \log_{10}$  и  $0,5 \log_{10}$  соответственно.

ДНК вакцины подвергаются тестированию на биоактивность и содержание ДНК с помощью методов количественного определения на основе параллельных профилей, которые сравнивают стандартный препарат с конечным продуктом.

### **2.3. Требования к утверждению / регистрации / лицензированию**

#### **2.3.1. Процесс производства**

Для регистрации вакцины против лихорадки Западного Нила все релевантные данные, касающиеся производства вакцины, процессов контроля при производстве и контроля качества (См. раздел С.2.а и b), должны быть представлены в органы власти. Результаты исследований должны быть представлены от трех последовательно выпущенных партий вакцины в объеме не менее 1/3 от типичного промышленного объема партии.

#### **2.3.2. Требования к безопасности**

Безопасность вакцинного штамма, если он используется в производстве живой вакцины, исследуется на уровне исходного вируса:

##### **i) Безопасность для целевых и нецелевых животных**

Расплодку следует исследовать на животных хозяевах в наиболее подходящем возрасте. Животные должны находиться под наблюдением на наличие клинической болезни и выделения/распространения вируса. Доза организма не должна быть меньше чем заявленная в конечной вакцине. Отдельные страны могут требовать превышения таких доз. Если вакцина предназначена для использования в особых субпопуляциях (напр. беременные животные), они также должны быть включены в исследования на безопасность на целевых животных. К тому же схожие исследования должны проводиться на восприимчивых нецелевых животных (напр. птицы).

ii) Возвращение к вирулентности аттенуированных/живых вакцин и экологические требования

Следует продемонстрировать, что повторные пассажи *in vivo* исходного посевного вируса не увеличивают вирулентность. (Для дополнительной информации см раздел: Исследования повышения вирулентности в Главе 1.1.8.).

Состав конечной вакцины (инактивированной или живой) следует исследовать на ограниченном количестве целевых животных до проведения полномасштабного полевого исследования. Состав конечной вакцины не должен вызывать негативных реакций.

Полевые исследования на безопасность следует проводить до того, как вакцина получает конечное разрешение. В целом следует использовать две серии исследований в трех различных географических районах и минимум 600 животных. Продукт следует вводить в соответствии с инструкциями к препарату (включая бустерные дозы) и должен содержать максимально разрешенное количество антигена вируса лихорадки Западного Нила. (Если не указано максимальное содержание антигена, серии должны иметь предполагаемую типичную послерегистрационную иммуногенность). Около одной трети животных должны быть в минимальном возрасте, рекомендуемом для вакцинации.

iii) Меры предосторожности (опасности)

Вакцина должна быть признана либо как безвредная, либо как патогенная для людей, осуществляющих вакцинацию. Производители должны указать, что в случае самовведения следует обратиться за медицинской помощью. Меры предосторожности должны быть указаны на этикетке продукта/листочке вкладыше, чтобы лицо, осуществляющее вакцинацию, знало о любой опасности.

### 2.3.3. Требования к эффективности

Для регистрации вакцины против лихорадки Западного Нила партия, произведенная в соответствии со стандартным методом, и содержащая минимальное количество антигена или значение иммуногенности, должна обеспечивать защиту против вирулентного контрольного заражения животного в минимальном возрасте, подходящем для вакцинации. Каждая будущая коммерческая партия должна подвергаться исследованиям до выпуска в оборот с целью обеспечения как минимум той же иммуногенности, что и у демонстрируемой партии, участвующей в исследованиях на эффективность.

Эффективность вакцины против лихорадки Западного Нила часто оценивается у вакцинируемых лошадей посредством оценки виремии, возникающей после контрольного заражения и/или неврологических признаков (напр. фасцикуляция мышц, атаксия, приступы). У аллигаторов эффективность оценивается посредством оценки виремии, возникающей после контрольного заражения и/или лимфогистиоционных поражений кожи. Рекомендуется использовать двадцать пять вакцинируемых животных и десять животных, вакцинируемых плацебо.

Лошадей можно контрольно заражать в полость позвоночного канала или посредством контролируемого подвешивания воздействию зараженных комаров. Все животные подлежат наблюдению в течение 14 – 21 дня после контрольного

заражения. Виремия должна быть оценена количественно (т.е. выявляемое присутствие или отсутствие). Эффект вакцинации можно оценить посредством подсчета части защищенных животных с учетом 95% доверительного интервала. Некоторые страны могут иметь минимальные требования к эффективности, но, ни в коем случае, нижний доверительный интервал не должен включать ноль.

#### **2.3.4. Вакцины, позволяющие проводить стратегию DIVA (выявление инфекции у вакцинированных животных)**

Вакцинация рекомендуется только у лошадей и аллигаторов в регионах, пораженных лихорадкой Западного Нила. Вакцинированные лошади могут вырабатывать серологические титры, которые могут повлиять на возможности экспорта таких лошадей.

#### **2.3.5. Длительность иммунитета**

Исследования по определению минимальной длительности иммунитета следует проводить до того, как вакцина получает окончательное утверждение. Длительность иммунитета должна быть продемонстрирована образом, схожим с первоначальным исследованием эффективности с контрольным заражением в конце ожидаемого периода действия защиты. Минимально, длительность должна быть равна продолжительности комариного сезона в инфицированных областях. Желательно продемонстрировать более длительный иммунитет у животных, подвергающихся более высокому риску, и в инфицированных зонах, где активность лета комаров длится круглый год.

#### **2.3.6. Стабильность**

Живые и инактивированные вакцины обычно имеют срок хранения в 18 или 24 месяца, соответственно. Исследования стабильности в реальном времени должны проводиться для подтверждения соответствия всех сроков годности. Маркировка продукта должна указывать надлежащие сроки хранения.

### **3. Вакцины, основанные на биотехнологиях**

В 2003 году МСХ США выдало лицензию на живую вакцину против лихорадки Западного Нила с вектором в виде оспы канареек для использования у лошадей. В 2005 году МСХ США выпустило первую полностью лицензированную ДНК вакцину против лихорадки Западного Нила для использования у животных в США. Вакцина содержит гены двух белков вируса лихорадки Западного Нила и поэтому не содержит цельный вирус лихорадки Западного Нила, живой или убитый. В конце 2006 года химерная вакцина, основанная на векторе в виде вируса желтой лихорадки, была лицензирована МСХ США для использования у лошадей. CVMP утвердил рекомбинантный продукт на основе вируса оспы канареек против лихорадки Западного Нила в 2011 году. Кроме выполнения требований к эффективности, иммуногенности, чистоте и безопасности, рекомбинантные посевы должны быть подвергнуты анализу риска. Заключение анализа риска должно свидетельствовать, что вакцина не наносит значительного влияния на окружающую среду.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

AUSTIN R.J., WHITING T.L., ANDERSON R.A. & DREBOT M.A. (2004). An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial

- introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can. Vet. J.*, 45, 117–123.
- BAKONYI T., IVANICS E., ERDELYI K., URSU K., FERENCZI E., WEISSENBOCK H. & NOWOTNY N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile Virus, central Europe. *Emerging Infect. Dis.*, 12, 618–623.
- BEATY B.J., CALISHER C.H. & SHOPE R.E. (1989). Arboviruses. In: *Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial infections*, Sixth Edition, Schmidt N.H. & Emmons R.W., eds. American Public Health Association, Washington DC, USA, 797–856.
- BERTHET F.-X., ZELLER H.G., DROUET M.-T., RAUZIÉ J., DIGOUTTE J.-P. & DEUBEL V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.*, 78, 2293–2297.
- BUNNING M.L., BOWEN R.A., CROPP B.C., SULLIVAN K.G., DAVIS B.S., KOMAR N., GODSEY M., BAKER D., HETTLER D.L., HOLMES D.A., BIGGERSTAFF B.J. & MITCHELL C.J. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 380–386.
- BURKE D.S. & MONATH T.P. (2001). Flaviviruses. In: *Fields Virology*, Fourth Edition, Knipe D.M. & Howley P.M., eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1043–1125.
- BURT F.J., GROBBELAAR A.A., LEMAN P.A., ANTHONY F.S., GIBSON G.V.F. & SWANEPOEL R. (2002). Phylogenetic relationships of Southern African West Nile virus isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 820–826.
- CAMPBELL G., LANCIOTTI R., BERNARD B. & LU H. (2002). Laboratory-acquired West Nile virus infections – United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 51, 1133–1135. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5150a2.htm>
- CANTILE C., DI GUARDO G., ELENI C. & ARISPICI M. (2000). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.*, 32, 31–35.
- DANIS K., PAPA A., PAPANIKOLAOU E., DOUGAS G, TERZAKI I., BAKA A., VRIONI G., KAPSIMALI V., TSAKRIS A., KANSOUZIDOU A., TSIODRAS S., VAKALIS N., BONOVAS S. & KREMASTINOJ. (2011). Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro. Surveill.*, Aug 25,16 (34).
- DAVIS B.S., CHANG G.J., CROPP B., ROEHRIG J.T., MARTIN D.A., MITCHELL C.J., BOWEN R. & BUNNING M.L. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.*, 75, 4040–4047.
- EIDEN M., VINA-RODRIGUEZ A., HOFFMANN B., ZIEGLER U. & GROSCHUP M.H. (2010). Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 22, 748–753.

- FROST M.J., ZHANG J., EDMONDS J.H., PROW N. A., GU X., DAVIS R., HORNITZKY C., ARZEY K.E., FINALAISON D., HICK P., READ A., HOBSON-PETERS J., MAY F.J., DOGGETT S.L., HANIOTIS J., RUSSELL R.C., HALL R.A., KHROMYKH A.A. & KIRKLAND P.D. (2012). Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 18, 792–800.
- HAYES C.G. (1989). West Nile fever. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 5, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 59–88.
- JOHNSON D.J., OSTLUND E.N., PEDERSEN D.D. & SCHMITT B.J. (2001). Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 739–741.
- LANCIOTTI R.S., KERST A.J., NASCI R.S., GODSEY M.S., MITCHELL C.J., SAVAGE H.M., KOMAR N., PANELLA N.A., ALLEN B.C., VOLPE K.E., DAVIS B.S. & ROEHRIG J.T. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4066–4071.
- MACKENZIE J.S. & WILLIAMS D.T. (2009). The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*, 56, 338–356.
- MORALES M.A., BARRANDEGUY M., FABBRI C., GARCIA J.B., VISSANI A., TRONO K., GUTIERREZ G., PIGRETTI S., MENCHACA H., GARRIDO N., TAYLOR N., FERNANDEZ F., LEVIS S. & ENRIA D. (2006). West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1559–1561.
- OSTLUND E.N., ANDRESEN J.E. & ANDRESEN M. (2000). West Nile encephalitis. *Vet. Clin. North Am., Equine Pract.*, 16, 427–441.
- OSTLUND E.N., CROM R.L., PEDERSEN D.D., JOHNSON D.J., WILLIAMS W.O. & SCHMITT B.J. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 665–669.
- PANTHIER R., HANNOUN C.L., OUDAR J., BEYTOUT D., CORNIOU B., JOUBERT L., GUILLON J.C. & MOUCHET J. (1966). Isolement du virus West Nile chez un cheval de Camargue atteint d'encéphalomyélite. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 262, 1308–1310.
- PLATONOV A.E., KARAN' L.S., SHOPENSKAIA T.A., FEDOROVA M.V., KOLIASNIKOVA N.M., RUSAKOVA N.M., SHISHKINA L.V., ARSHBA T.E., ZHURAVLEV V.I., GOVORUKHINA M.V., VALENTSEVA A.A. & SHIPULIN G.A. (2011). Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2, 29–37.
- SAVINI G., CAPELLI G., MONACO F., POLCI A., RUSSO F., DI GENNARO A., MARINI V., TEODORI L., MONTARSI F., PINONI C., PISCIELLA M., TERREGINO C., MARANGON S., CAPUA I. & LELLI R. (2012). Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet Microbiol.*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.018>.

SCHMIDT J.R. & EL MANSOURY H.K. (1963). Natural and experimental infection of Egyptian equines with West Nile virus. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 57, 415–427.

SIRBU A., CEIANU C.S., PANCULESCU-GATEJ R.I., VAZQUEZ A., TENORIO A., REBREANU R., NIEDRIG M., NICOLESCU G., & PISTOL A. (2011). Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *EuroSurveill.* JAN 13, 16 (2).

SMITHBURN K.C., HUGHES T. P., BURKE A.W. & PAUL J.H. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med.*, 20, 471–492.

SNOOK C.S., HYMANN S.S., DEL PIERO F., PALMER J.E., OSTLUND E.N. BARR B.S., DEROSCHERS A.M. & REILLY L.K. (2001). West Nile virus encephalomyelitis in eight horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 218, 1576–1579.

STEELE K.E., LINN M.J., SCHOEPP R.J., KOMAR N., GEISBERT T.W., MANDUCA R.M., CALLE P.P., RAPHAEL B.L., CLIPPINGER T.L., LARSEN T., SMITH J., LANCIOTTI R.S., PANELLA N.A. & MCNAMARA T.S. (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet. Pathol.*, 37, 208–224.

VAZQUEZ A., SANCHEZ-SECO M.P., RUIZ S., MOLERO F., HERNANDEZ L., MORENO J., MAGALLANES A., TEJEDOR C.G. & TENORIO A. (2010). Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 549–552. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2011). Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services Memorandum 800.112 Guidelines for Validation of In Vitro Potency Assays at: URL: [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/vet\\_biologics/publications/memo\\_800\\_112.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/memo_800_112.pdf)

WEINGARTL H.M., DREBOT M.A., HUBALEK Z., HALOUZKA J., ANDONOVA M., DIBERNARDO A., COTTAM-BIRT C., LARENCE J. & MARSZAL P. (2003). Comparison of assays for detection of West Nile virus antibodies in chicken sera. *Can. J. Vet. Res.*, 67, 128–132.

WODAK E., RICHTER S., BAGÓ Z., REVILLA-FERNÁNDEZ S., WEISSENBOCK H. NOWOTNY N. & WINTER P. (2011). Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet. Microbiol.*, 149, 358–366.

ZELLER H.G. & SCHUFFENECKER I. (2004). West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23, 147–156.

\*

\*\*

**NB:** Существуют Справочные лаборатории МЭБ по лихорадке Западного Нила (См. Таблицу Части 4 этого *Руководства по наземным животным* или сайт МЭБ, чтобы получить самый последний список: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> <http://www.oie.int/>). Свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения любой дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против лихорадки Западного Нила