

ГЛАВА 3.1.7

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ

РЕЗЮМЕ

*Эпизоотическая геморрагическая болезнь (ЭГБ) – это трансмиссивное инфекционное неконтагиозное вирусное заболевание домашних и диких жвачных, в основном, белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus*) и крупного рогатого скота (КРС). Овцы и козы также относятся к восприимчивым видам животных, однако, у них болезнь протекает, как правило, в субклинической форме.*

*Вирус ЭГБ распространяется среди жвачных животных кровососущими мокрецами вида *Culicoides*, поэтому инфекции ЭГБ носят ярко выраженный сезонный характер. Самым восприимчивым видом считается белохвостый олень, у которого болезнь протекает в сверхострой форме с высоким уровнем смертности. У КРС клинические признаки заболевания отмечаются редко, хотя известны случаи, когда болезнь характеризовалась такими проявлениями, как лихорадка, анорексия, дисфагия, истощение, язвенный стоматит, хромота, дыхательная недостаточность и покраснение вымени.*

Идентификация возбудителя: *Вирус ЭГБ принадлежит к семейству *Reoviridae*, род *Orbivirus* и обладает общими морфологическими и структурными характеристиками с другими членами данного рода, особенно, с вирусом блутанга.*

Частицы вируса ЭГБ не имеют оболочки, но защищены капсидом с икосаэдрической симметрией. Кор вируса содержит 10 сегментов двухцепочечной геномной РНК, которые кодируют 7 структурных белков (VP) и три или четыре неструктурных белка. Белок VP2 внешнего кора обуславливает серотип-специфичность вируса, в то время как VP7 внутреннего кора обладает антигенами, специфичными для разных серогрупп. Обнаружено не менее 7 разных серотипов вируса, хотя в отношении точного числа серотипов существует некоторая неопределенность, вследствие чего панель эталонных штаммов вируса ЭГБ пока официально не установлена.

Методы идентификации вируса ЭГБ в полевых пробах включают выделение вируса из культуры ткани, полимеразные цепные реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), специфичные для разных серогрупп, и конкурентный (с захватом антигена) и сэндвичный варианты твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Разработаны методы серотип-специфичной ОТ-ПЦР для определения принадлежности изолятов вируса, выделенных из культуры ткани, к определенному серотипу. Изоляты также можно идентифицировать методами высокоэффективного секвенирования или в реакциях нейтрализации вируса.

Серологические тесты: *Антитела к вирусу ЭГБ, как правило, можно обнаружить, начиная с 10-14 дня после заражения. В организме животных могут одновременно*

присутствовать и нейтрализующие антитела, и сам вирус, что обусловлено, вероятно, сильной ассоциацией вируса ЭГБ с эритроцитами.

Для обнаружения антител к вирусу ЭГБ в сыворотке животных с подозрением на инфекцию рекомендуется использовать конкурентный вариант ИФА со специфичными моноклональными антителами (кИФА). Конкурентный ИФА – это экспресс-тест, обнаруживающий антитела к белку VP7. Возможно также применение реакций нейтрализации вируса. Реакцию нейтрализации вируса обычно проводят с целью выявления заражения определенными серотипами вируса ЭГБ. Данный метод требует больше времени (3-5 дней) и усилий, при этом перекрестные реакции между серотипами могут воспрепятствовать получению оптимальных результатов. Возможно применение таких методов, как иммунодиффузия в агаровом геле и непрямой ИФА, однако, они имеют существенные недостатки: неспособность дифференцировать антитела к вирусу ЭГБ и вирусу блутанга.

Требования к вакцинам: В США разработана и применяется аутологичная вакцина, предназначенная для применения только у содержащихся в неволе диких северных оленей. В Японии разработана вакцина для КРС. Учитывая, что кроме этих двух вакцин других подобных препаратов пока не существует, можно сказать, что лаборатории и производители вакцин проявляют мало интереса к разработке вакцин для контроля заболевания или циркуляции вируса ЭГБ.

А. ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическая геморрагическая болезнь (ЭГБ) – это инфекционное неконтагиозное вирусное заболевание, передаваемое насекомыми рода *Culicoides*. Согласно имеющимся данным виды *Culicoides*, которые переносят вирус ЭГБ, очень схожи с теми видами, которые переносят вирус блутанга (Carpenter *et al.*, 2008). Заболевание поражает как домашних, так и диких животных из семейства жвачные, а особенно, животных Северной Америки из семейства *Cervidae* и – в меньшей степени – крупный рогатый скот (Bréard *et al.*, 2004), хотя многие страны сообщали только о бессимптомной форме инфекции (Gard & Melville, 1992; St George *et al.*, 1983). Овцы и козы тоже считаются восприимчивыми к инфекции вирусом ЭГБ, однако, их роль как хозяев пока не установлена.

У восприимчивых видов животных вирус ЭГБ может вызывать болезнь с клиническими проявлениями, схожими с таковыми при инфекции вирусом блутанга. Белохвостый олень (*Odocoileus virginianus*) – это вид, наиболее серьезно поражаемый инфекцией, протекающей у этих животных в сверхострой форме с лихорадкой, анорексией, респираторной недостаточностью и тяжелым отеком головы и шеи. Также может наблюдаться отек языка и конъюнктивы. При острой (или классической) форме эти клинические признаки могут сопровождаться геморрагическими поражениями многих тканей, включая кожу и сердце, у животных также могут возникать язвы или эрозии языка, зубной подушки, рубца и сычуга (Savini *et al.*, 2011).

Гистопатологические поражения включают распространенный васкулит с тромбозом, отеком эндотелия, геморрагиями и некрозом сразу в нескольких органах, особенно, в языке, слюнных железах, преджелудке, аорте и сосочкой мышце левого желудочка

миокарда. Также описывали отдельные серые бляшки на поверхности слизистой желчного пузыря (Noon et al., 2002).

У крупного рогатого скота болезнь манифестирует лихорадкой, анорексией, язвенным стоматитом, отеком век, дыхательной недостаточностью, выделениями из носа и глаз, покраснением и шелушением носового зеркала и губ, хромотой, покраснением вымени и трудностями при глотании (Temizel et al., 2009). Болезнь Ибараки у КРС вызывает штамм вируса ЭГБ типа 2 (Anthony et al., 2009). У животных наблюдается обезвоживание и истощение, и в некоторых случаях болезнь заканчивается смертельным исходом вследствие аспирационной пневмонии. При гистологическом исследовании обнаруживают гиалиновую дегенерацию, некроз и минерализацию поперечнополосатой мышцы на фоне инфильтрации нейтрофилов, лимфоцитов и гистиоцитов (Ohashi et al., 1999; Savini et al., 2011).

Случаев заражения человека вирусам ЭГБ не зарегистрировано ни в естественных, ни в экспериментальных условиях.

С таксономической точки зрения вирус ЭГБ относится к роду *Orbivirus* семейства *Reoviridae* (McLachlan & Osburn, 2004). Геном вируса представлен двухцепочечной РНК с 10 сегментами. В настоящее время выявлено 7 серотипов этого вируса, однако, в научном сообществе вопрос о точном количестве серотипов пока остается открытым (Anthony et al., 2010). Вирус стабилен при -70°C , а в крови, тканевых суспензиях или отмытых клетках крови – при 4°C . На различных поверхностях в лаборатории вирус инактивируют 95% этанолом и 0,5% раствором гипохлорита натрия.

Частицы вируса ЭГБ состоят из трех белковых слоев. Внешняя оболочка капсида состоит из двух белков, VP2 и VP5. Как и у вируса блутанга белок VP2 в наибольшей степени обуславливает серотип-специфичность. VP5, другой внешний белок, также может вызывать образование нейтрализующих антител (Savini et al., 2011; Schwartz-Cornill et al., 2008). Этот внешний капсид легко отсоединяется от двухслойной икосаэдрической коровой частицы, которая состоит из двух главных белков – VP7 и VP3 и окружает транскриптазный комплекс (VP1, VP4 и VP6) и сегменты геномной РНК. VP7 – это иммунодоминантный белок, обуславливающий принадлежность вируса к определенной серогруппе и используемый в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), который и позволяет определить серотип вируса (Saif, 2011). Вирусная РНК также кодирует три из четырех неструктурных белков (Belhouchet et al., 2011).

Превалентность ЭГБ как трансмиссивного вирусного заболевания ограничивается распространением компетентных векторов вида *Culicoides* (Mellor et al., 2008). Вирус ЭГБ выделяли у диких и домашних жвачных, а также у членистоногих в Северной Америке, Азии, Африке и Австралии, а в последнее время – в странах Средиземноморского бассейна: Марокко, Алжире, Тунисе, Израиле, Иордании и Турции. В Европе случаев заражения вирусом ЭГБ зарегистрировано не было. Вспышки болезни обычно совпадают с сезонным повышением численности популяции переносчика, поэтому большинство случаев ЭГБ отмечают поздним летом и осенью (Mellor et al., 2008; Stallknecht & Howert, 2004).

Ввиду ее трансмиссивного характера данную инфекцию сложно контролировать и почти невозможно искоренить, если она уже укоренилась в определенной популяции. На

распространение и персистенцию (повторное возникновение) вируса ЭГБ в определенном регионе влияют такие непредсказуемые и неконтролируемые факторы, как климат и география региона, а также высокая численность насекомых-переносчиков вируса. Кроме того, на данный момент не проведено подробных исследований эффективности мер по контролю болезни, применяемых в странах, в которых болезнь поразила скот. Определенный риск заражения может быть связан с парентеральным введением животным, не сталкивавшимся с инфекцией, сывороток, полученных от животных с вирусемией. Самая высокая вероятность заражения вирусом ЭГБ возникает при парентеральном введении последнего восприимчивым животным. В присутствии соответствующих насекомых вида *Culicoides* вирус может передаваться другим хозяевам, поэтому необходимо обеспечить контроль животных, инфицированных вирусом ЭГБ, в период вирусемии и защиту их от *Culicoides* физическими средствами.

Возможность заражения человека вирусом ЭГБ не установлена. Меры контроля биологических рисков определяют на основании анализа рисков, описанного в Главе 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Руководство по управлению биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследования для диагностики ЭГБ и их цель

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции–надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
ОТ-ПЦР в реальном времени	-	+++	-	++	++	-
ОТ-ПЦР	-	++	-	++	++	-
Выделение в клеточной культуре	-	+++	-	++	-	-
Обнаружение иммунного ответа						
кИФА (для определения серогруппы)	++	+++	++	-	++	++
РНВ (серотип-	+++	++	+++	-	+++	+++

¹ При исследовании образца рекомендуется использовать комбинацию методов идентификации агента.

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции–надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
специфичный)						
РИД	+	-	+	-	+	+
РСК	+	-	+	-	+	+

Примечания: +++ = рекомендованный метод; ++ = подходящий метод; + = применение данного метода возможно в определенных обстоятельствах, хотя стоимость, надежность и другие факторы существенно ограничивают возможность его применения; - = метод не подходит для данной цели.

Хотя не все тесты, включенные в категории +++ или ++, прошли формальную валидацию, их рутинный характер и факт их широкого применения без получения сомнительных результатов делает их достаточно приемлемыми.

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; кИФА = конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ; РНВ = реакция нейтрализации вируса; РИД = иммунодиффузия в агаровом геле; РСК = реакция связывания комплемента.

Клинические признаки ЭГБ у диких животных и КРС схожи с таковыми при болезни блутанга у овец и КРС, а также с клиническими проявлениями, наблюдающимися при других болезнях КРС, таких как вирусная диарея КРС/болезнь слизистых, инфекционный ринотрахеит КРС, везикулярный стоматит, злокачественная катаральная лихорадка и эфемерная лихорадка КРС. Окончательный диагноз инфекции вирусом ЭГБ требует проведения определенных лабораторных тестов.

1. Идентификация возбудителя ЭГБ

1.1. Культивирование *in vitro*

1.1.1. Выделение в клеточной культуре

Для исследования образцов от диких и домашних животных используют одни и те же диагностические методы. Возбудитель болезни можно выделить из крови животных с вирусемией, из образцов тканей, включая селезенку, легкие и лимфоузлы, из инфицированных туш животных, а также из насекомых вида *Culicoides spp.* Вирус ЭГБ выделяют путем заражения клеточных культур, таких как эндотелий легочных артерий КРС, линия клеток почки хомячка (ВНК-21) и линия клеток африканской зеленой мартышки (Vero) (Aradaib *et al.*, 1994), при этом последние две линии чаще всего используют для размножения вируса. Для выделения вируса также можно использовать клеточные линии *Aedes albopictus* (например, С6/36) и *Culicoides variipennis* (Кс) (Batten *et al.*, 2011; Eschembauer *et al.*, 2012; Gard *et al.*, 1989), а также куриные эмбрионы, однако, в этой культуре клеток чувствительность будет более низкой (Eschembauer *et al.*, 2012). Цитопатогенный эффект (ЦПЭ), наблюдающийся только в клеточных линиях млекопитающих, обычно возникает через 2-7 дней после заражения, однако, для подтверждения может потребоваться слепой пассаж.

Ниже представлена общая процедура выделения вируса в клеточной культуре, которую можно модифицировать в соответствии с нуждами определенной лаборатории. Инкубирование клеточных культур для выделения вируса ЭГБ обычно проводят во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂.

- i) Из образцов тканей от животных с клиническими признаками инфекции готовят 10-30% тканевые суспензии в клеточной культуре или в других соответствующих средах, содержащих антибиотики. Затем тканевые суспензии центрифугируют, а супернатант используют для выделения вируса.
- ii) Образцы несвернувшейся крови центрифугируют для разделения эритроцитов и плазмы. Плазму выбрасывают и заменяют фосфатно-буферным раствором (ФБР). Кровь снова центрифугируют для отделения эритроцитов. Эритроциты трижды отмывают в ФБР. 0,2 мл эритроцитов переносят в 4,0 мл стерильной дистиллированной воды для лизиса. Лизирование эритроцитов также можно осуществить методом обработки ультразвуком. 6,0 мл забуференного лактозо-пептонного бульона добавляют к образцу. Клетки центрифугируют, а супернатант используют для выделения вируса.
- iii) Из сосуда, содержащего свежие клеточные монослои (1-3 суток), сливают среду.
- iv) Клетки заражают фракцией очищенной ткани или суспензией эритроцитов или клеточной культурой предыдущего пассажа.
- v) Клетки инкубируют при 34-37°C в течение 1 часа. Для свободного прохождения газов крышки флаконов с клеточными культурами следует ослабить или использовать вентилируемые крышки.
- vi) Инокулят отбрасывают, а монослой отмывают средой, содержащей антибиотики, один или два раза. Вносят поддерживающую среду и возвращают в инкубатор.
- vii) Клетки ежедневно наблюдают на предмет ЦПЭ. ЦПЭ наблюдается только в клеточных линиях млекопитающих и обычно развивается через 2-7 дней после заражения.
- viii) При отсутствии ЦПЭ проводят второй и третий пассаж. Клетки соскребают скребком или проводят один цикл замораживания-оттаивания, а затем заражают свежие культуры.
- ix) Если ЦПЭ наблюдается, что говорит о присутствии вируса, идентичность изолята подтверждают методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), ИФА с захватом антигена, в реакциях иммунофлуоресценции или нейтрализации вируса.

1.1.2. Определение серогрупповой принадлежности изолята

- i) *Молекулярные методы*
Методы ПЦР см. в Разделе 1.2.1.
- ii) *Иммунологические методы*

Серогруппу изолята орбивирусов обычно определяют по его реакции со специфичными эталонными антисыворотками, обнаруживающими такие белки, как VP7, которые являются консервативными для каждой из серогрупп. В связи с перекрестной реактивностью между членами серогрупп ЭГБ и блутанга возникает возможность того, что изолят блутанга может быть ошибочно принят за изолят вируса ЭГБ на основании слабоположительной реакции иммунофлуоресценции с поликлональной антисывороткой к вирусу ЭГБ. По этой причине следует использовать моноклональные антитела, специфичные к определенным серогруппам. Такие специфичные для серогрупп реактивы уже разработаны в ряде лабораторий (Luo & Sabara, 2005; Mecham & Jochim, 2000; Mecham & Wilson, 2004; White *et al.*, 1991). Ниже перечислены методы, используемые для определения серогруппы вируса.

a) Реакция иммунофлуоресценции

Монослой клеток ВНК-21 или Vero в слайд-камерах (стеклянные покровные стекла) заражают вирусом, адаптированным к тканевой культуре, или вирусом в лизатах клеток насекомых. После инкубирования в течение 24-48 часов при 37°C или после возникновения слабовыраженного ЦПЭ зараженные клетки фиксируют с использованием таких веществ, как параформальдегид, ацетон или метанол, высушивают, а затем антиген вируса детектируют с использованием антисыворотки к вирусу ЭГБ или вирус-специфичных моноклональных антител с проведением стандартных процедур реакции иммунофлуоресценции.

b) Сэндвичный вариант ИФА, специфичный для серогрупп

Специфичный для серогрупп сэндвичный вариант ИФА позволяет обнаруживать вирус ЭГБ в инфицированных насекомых или в препаратах культур тканей (Thevasagayam *et al.*, 1996). Этот метод разработан специально для вируса ЭГБ и не дает перекрестных реакций с другими орбивирусами, такими как вирус блутанга и вирус африканской чумы лошадей.

1.1.3. Определение принадлежности изолята вируса ЭГБ к определенному серотипу

i) *Молекулярные методы*

a) Полимеразная цепная реакция

Идентификация геномов изолятов вируса ЭГБ позволила разработать молекулярные методы определения серотипа и/или топотипа вируса с помощью ОТ-ПЦР со специфичными к серотипам праймерами с последующим секвенированием (Maan *et al.*, 2010).

b) Высокоэффективное секвенирование

Высокоэффективное секвенирование проводят с использованием специфичных к серотипам праймеров или без таковых. С целью установления серотипа последовательности сравнивают с данными в GenBank.

ii) *Иммунологические методы*

а) Серотипирование в реакции нейтрализации вируса

Существует несколько методов обнаружения присутствия нейтрализующих антител к вирусу ЭГБ в тканевых культурах. В качестве клеточных линий чаще всего используют линии ВНК-21 и Vero. Два метода серотипирования вируса ЭГБ кратко описаны ниже. Серотип-специфичные антисыворотки, полученные в результате пассирования в морских свинках или кроликах, в меньшей степени демонстрируют тенденцию к перекрестной реактивности между серотипами, чем антисыворотки, полученные в КРС или овцах. В тесты обязательно следует включать контроль антисыворотки.

- Реакция подавления бляшкообразования

Вирус, подлежащий серотипированию, разводят сериями и инкубируют в отсутствие антисыворотки или в присутствии отдельных эталонных антисывороток в постоянном разведении к панели серотипов вируса ЭГБ. Смеси вирус/антисыворотка вносят в монослой клеток и оставляют для абсорбирования на 1 час при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. После этого инокулят удаляют, а монослой покрывают клеточной культуральной средой, содержащей 0,8-0,9% агарозы. Планшеты/флаконы инкубируют при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Через 4 дня инкубирования наносят второй верхний слой из клеточной культуральной среды, содержащей 0,01% (1 часть на 10000) нейтрального красного и 0,8-0,9% агарозы, и планшеты/флаконы инкубируют 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Флаконы просматривают ежедневно на предмет возникновения видимых бляшек еще в течение 3 дней. Титр нейтрализующих антител выражают в виде обратной величины разведения сыворотки, индуцирующего установленный уровень снижения (например, 90%) количества бляшкообразующих единиц. Неидентифицированный вирус считается серологически идентичным эталонному серотипу, если последний, тестируемый параллельно с нетипированным вирусом в той же реакции, демонстрирует такую же степень нейтрализации.

- Реакция микронейтрализации

По 50 мкл эталонного вируса или серийного разведения нетипированного вируса в дозе примерно 100 ТЦД₅₀ (50% доза,

инфицирующая тканевую культуру) вносят в лунки плоскодонного титрационного микропланшета и смешивают с равным объемом эталонной антисыворотки, разведенной в тканевой культуральной среде при постоянном факторе разведения. После инкубирования в течение 1 часа при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂ в каждую лунку вносят примерно 10⁴ клеток в объеме 100 мкл и планшеты инкубируют в течение 3-5 дней при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Результаты реакции учитывают с использованием инвертированного микроскопа. Лункам присваивают баллы по степени выраженности ЦПЭ. В лунках, в которых содержатся только клетки или клетки и антисыворотка, ЦПЭ должен отсутствовать. И наоборот: в лунках, содержащих клетки и вирус, должен наблюдаться 75-100% ЦПЭ. Неидентифицированный вирус считается серологически идентичным эталонному серотипу вируса ЭГБ, если нейтрализация обоих вирусов в данной реакции выражена примерно в одинаковой степени, то есть 75%, при наличии 100% защиты монослоя.

1.2. Молекулярные методы – обнаружение нуклеиновой кислоты

1.2.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

В последние годы серьезные усилия были направлены на разработку инновационных молекулярных методов, таких как ОТ-ПЦР, для быстрого обнаружения нуклеиновой кислоты вируса ЭГБ (Aradaib *et al.*, 2003; Clavijo *et al.*, 2010; Wilson, 1994; Wilson *et al.*, 2009). ОТ-ПЦР позволяет обнаруживать РНК вируса ЭГБ в образцах крови и в других тканях. Кроме того, разработаны серотип-специфичные методы ОТ-ПЦР, мишенью которых является сегмент 2 вирусной РНК (Brodie *et al.*, 1998; Maan *et al.*, 2010), а также мультиплексные форматы ОТ-ПЦР в реальном времени для дифференциации вируса ЭГБ и вируса блутанга (Wilson *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2010). Хотя ОТ-ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью, диагноз, поставленный на основании результатов ОТ-ПЦР следует интерпретировать с осторожностью: методы ОТ-ПЦР позволяют обнаруживать вирусную РНК с высоким уровнем чувствительности, но не обязательно указывают на присутствие инфекционного вируса. Продолжительность периода обнаружения нуклеиновой кислоты вируса ЭГБ в крови в ОТ-ПЦР пока не установлена, но имеются данные о том, что этот период превышает таковой, в течение которого можно выделить инфекционный вирус, что продемонстрировано на примере вируса блутанга.

Способность ОТ-ПЦР обнаруживать очень небольшие количества молекул нуклеиновой кислоты означает, что данный метод чрезвычайно чувствителен к контаминации посторонними нуклеиновыми кислотами. Последние могут включать праймеры, используемые в лаборатории, или ранее амплифицированные полинуклеотиды, следовательно, очень важно иметь

«чистую» зону, где будет храниться все оборудование, необходимое для подготовки реактивов для исследования, и отдельную зону с оборудованием для амплификации. На всех стадиях проведения процедуры следует носить непроницаемые перчатки, которые нужно регулярно менять, особенно, после работы с образцом РНК или с амплифицированной ДНК. Это поможет защитить реактивы и образцы от контаминации повсеместно распространенными РНКазами, а другие реактивы от перекрестной контаминации ДНК.

i) *Экстрагирование РНК из крови, насекомых и образцов тканей*

В продаже имеется множество наборов; этап экстрагирования РНК необходимо адаптировать к исследуемому образцу (например, для крови или ткани) и проводить в соответствии с указаниями производителя.

ii) *Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией*

В настоящее время на рынке представлено несколько наборов для одноэтапной ОТ-ПЦР. Кроме одноэтапного формата возможно проведение двухэтапной процедуры теста, который состоит из первоначального этапа ОТ с последующей амплификацией кДНК. Большинство из этих методов пока еще официально не валидированы. Общие рекомендации к проведению исследования приведены ниже. Данные рекомендации могут быть изменены в зависимости от потребностей конкретной лаборатории или в зависимости от конкретной ситуации. В качестве примера традиционной ОТ-ПЦР представлен метод, описанный Aradaib *et al.* (2003), мишенью которого является S6 вируса ЭГБ.

Последовательности праймеров

Прямой: 5'-TCG-AAG-AGC-TGA-TGA-ATC-GC-3'

Обратный: 5'-TCA-TCT-ACT-GCA-TCT-GGC-TG-3'

- a) Исходные растворы праймеров разводят до конечной концентрации 10 пмоль/мкл.
- b) Пробирки для одноэтапной ОТ-ПЦР маркируют, а затем в каждую пробирку вносят по 4,0 мкл смеси праймеров. Пробирки выдерживают на льду.
- c) Затем, в пробирки для одноэтапной ОТ-ПЦР, содержащие по 4 мкл смеси праймеров, вносят по 4 мкл образцов исследуемой, положительной и контрольной РНК.
- d) Термическая денатурация: 95°C в течение 5 минут, затем на льду в течение 3 минут.
- e) Смесь для одноэтапной ОТ-ПЦР, приготовленная с соблюдением рекомендаций производителя, содержит реактивы в достаточном объеме для того количества образцов, которое подлежит исследованию.
- f) Смесь для одноэтапной ОТ-ПЦР добавляют к денатурированной смеси до конечного объема 50 мкл.

g) Пробирки помещают в термоциклер, запрограммированный для проведения обратной транскрипции с последующей амплификацией кДНК, как описано производителем.

iii) *Электрофоретический анализ продукта ПЦР*

Присутствие вируса ЭГБ в продуктах ОТ-ПЦР можно визуализировать с использованием стандартной процедуры электрофореза.

1.2.2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени

Для обнаружения РНК вируса ЭГБ в патологических пробах используют методы на основе ОТ-ПЦР. Мишенью методов ОТ-ПЦР, специфичных для определенных серогрупп, являются высококонсервативные гены вируса ЭГБ S6 или S10 или менее высококонсервативные гены, включая S3. Однако ни один из этих методов не способен дифференцировать сразу все серотипы вируса ЭГБ. Информация о способности опубликованных методов обнаруживать все серотипы весьма ограничена или отсутствует; метод ОТ-ПЦР в реальном времени, описанный ниже (Clavijo *et al.*, 2010), позволяет распознавать и количественно характеризовать все серотипы вируса ЭГБ. Целевой ген этого метода – ген NS1.

Последовательности праймеров

Прямой: 5'-ACW-GGV-ATC-ATG-TTT-GAG-CT-3'; обратный: 5'-TTC-ATA-ACC-GCA-CCT-TCA-TC-3', соответствующий позициям оснований 1495–1605 гена NS1.

Последовательности зондов

P1: 6FAM-TCA-TCA-CAC-ATC-GGC-MGB-NFQ; P2: 6FAM-TCT-CGG-CAT-ATG-CGA-GCM-GBN-FQ, соответствующий позициям оснований 1516–1550.

Амплификацию методом ПЦР осуществляют с использованием набора для одноэтапной ОТ-ПЦР. Смеси содержат 1 × буфер, 3 ммоль MgSO₄, 4 пмоль прямого праймера, 20 пмоль обратного праймера, 4,5 пмоль зонда 1, 1,5 пмоль зонда 2, 0,5 мкл смеси Taq и 3 мкл матрицы в общем объеме реакционной смеси, равном 25 мкл. Амплификацию и детектирование флуоресценции проводили с использованием системы обнаружения последовательности в программе, включающей этап обратной транскрипции при 45°C в течение 40 минут с последующими этапами инактивации и денатурирования при 95°C в течение 10 минут. Цикл амплификации методом ПЦР состоит из 45 циклов при 95°C в течение 15 секунд, при 50°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 30 секунд с финальным этапом удлинения при 72°C в течение 3 минут.

Данный метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, и в присутствии хотя бы одного из 24 серотипов вируса блутанга амплификация не происходит. В продаже имеются коммерческие наборы для ОТ-ПЦР в реальном времени на основе сегмента генома 9, которые уже нашли широкое применение. С помощью данного набора можно обнаружить все известные

серотипы вируса ЭГБ уже через 2 дня после возможного заражения (Batten et al., 2012).

2. Серологические методы

После заражения вирусом ЭГБ антитела можно обнаружить, начиная с 10-14 дня после заражения (Eschbaumer *et al.*, 2012; Quist *et al.*, 1997). Как и в случае с вирусом блутанга, животные, инфицированные вирусом ЭГБ, могут одновременно вырабатывать нейтрализующие антитела к вирусу и являться носителями вируса в крови; это, вероятно, обусловлено сильной ассоциацией между вирусами и эритроцитами. Продолжительность приобретенного иммунитета не установлена, однако, данные, полученные в ходе изучения случаев естественного инфицирования, свидетельствуют о том, что он может длиться всю жизнь. Существует ряд серологических методов с разной степенью чувствительности и специфичности, позволяющих обнаруживать антитела к вирусу ЭГБ, специфичные к серогруппам и серотипам.

2.1. Конкурентный твердофазный иммуоферментный анализ (КИФА)

Конкурентный вариант ИФА для ЭГБ разработан с целью измерения вирус-специфичных антител без перекрестной реакции с антителами к другим орбивирусам. В этих методах, которые в настоящее время уже считаются предпочтительными, используются специфичные моноклональные антитела против VP7 вируса ЭГБ, которые способны выявить антитела к вирусу ЭГБ, специфичные к различным серотипам (Luo & Sabara, 2005; Mecham & Jochim, 2000; Mecham & Wilson, 2004; White *et al.*, 1991).

2.1.1. Процедура исследования

Описано несколько процедур исследования; ниже представлен пример процедуры КИФА для ЭГБ, он практически не отличается от традиционного метода КИФА кроме того, что в ходе КИФА для ЭГБ происходит захват рекомбинантного VP7, экспрессированного в бакуловирусе, кроличьими поликлональными антителами к VP7, предварительно абсорбированными в лунках (Mecham & Wilson, 2004).

- i) 96-луночные титрационные микропланшеты сенсibiliзируют 100 мкл рекомбинантного VP7, экспрессированного в бакуловирусе, в течение ночи при 4°C (Luo & Sabara, 2005), затем разводят в 0,05 моль карбонатного буфера, pH 9,6.
- ii) После этого планшеты отмывают три раза ФБРТ (0,01 моль ФБР с добавлением 0,05% или 0,1% твин 20, pH 7,4), а затем блокируют в течение 1 часа 5% сухим молоком при комнатной температуре.
- iii) После отмывки в ФБРТ в лунки вносят по 100 мкл исследуемых сывороток в двойных экземплярах в одном разведении: 1/5, 1/10 или 1/20 в ФБРТ, содержащем 2,5% сухого молока.
- iv) Сразу после этого в каждую лунку вносят по 100 мкл установленного разведения моноклональных антител в ФБРТ. Контрольные лунки для моноклональных антител содержат только разбавитель вместо исследуемой сыворотки.

- v) Планшеты инкубируют в течение 1 часа при 37°C, а затем снова отмывают в ФБРТ, как описано выше.
- vi) После отмывки лунки заполняют 100 мкл соответствующего разведения вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в ФБРТ.
- vii) После инкубирования в течение 1 часа при 37°C раствор конъюгата выбрасывают, а планшеты три раза отмывают с помощью ФБРТ. В лунки вносят по 100 мкл раствора субстрата, и планшеты встряхивают на шейкере при комнатной температуре в течение 30 минут.
- viii) Реакцию останавливают путем добавления соответствующего агента, и после учета реакции в ридере ИФА в бланковых лунках, содержащих субстрат и останавливающий реакцию агент, фиксируют показатели оптической плотности с использованием соответствующих фильтров.
- ix) Результаты выражают в виде процента торможения, получаемого на основе среднего значения показателей оптической плотности всех образцов, по следующей формуле:

$$\% \text{ торможения} = 100 - [(\text{среднее значение оптической плотности образца}) / (\text{среднее значение оптической плотности контроля моноклонального антитела}) \times 100]$$

NB: Некоторые лаборатории предпочитают вместо контроля моноклональных антител использовать отрицательную контрольную сыворотку, процент торможения которой ранее был установлен как ноль.
- x) Образцы с показателями процента торможения >50% считают положительными. Образцы с показателями процента торможения от 40% до 50% считают подозрительными. Результаты дубликатов исследуемых сывороток могут различаться, но считаются приемлемыми, если они лежат с одной стороны точки раздела для положительного результата.
- xi) В каждый планшет следует включать сильно положительные и слабоположительные сыворотки и отрицательную сыворотку. Степень подавления слабоположительной сыворотки должен составлять 60-80%, а степень подавления отрицательной сыворотки должен составлять менее 40%.

В продаже имеются коммерческие наборы кИФА с использованием рекомбинантного VP7 и моноклональных антител к VP7. Эти анализы уже широко применяются во многих лабораториях по всему миру.

2.2. Реакция нейтрализации вируса

Золотым стандартом идентификации и количественного определения антител к серотипам вируса ЭГБ, присутствующим в исследуемых образцах, является реакция нейтрализации вируса. Этот метод позволяет обнаруживать и измерять уровень антител, специфичных к разным серотипам. Основным недостатком данного метода является то, что в анализ нужно обязательно включить все

серотипы подозреваемого вируса, что требует много времени и усилий. Проведение реакции нейтрализации занимает 3-5 дней (Pearson *et al.*, 1992).

2.2.1. Процедура исследования

В качестве клеточных линий чаще всего используют клетки ВНК-21 и Vero. Обнаружение титра, равного 1/10 или выше, указывает на присутствие вируса ЭГБ.

Доказано, что антисыворотки, специфичные для разных серотипов вируса ЭГБ, полученные в морских свинках или кроликах, обладают меньшей перекрестной реактивностью, чем те же антисыворотки, полученные в КРС или овцах. Включение контроля антисыворотки является обязательным.

- i) По 50 мкл сывороток в серийных разведениях от 1/10 до 1/1280 вносят в каждую тестовую лунку плоскодонного титрационного микропланшета, а затем смешивают с равными объемами известных серотипов вируса ЭГБ (100 ТЦД₅₀). Планшеты инкубируют при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂.
- ii) После инкубирования в течение 1 часа в лунки вносят примерно 10⁴ клеток Vero в объеме 100 мкл, затем минимальную эссенциальную среду с антибиотиками, и после инкубирования в течение 4-6 дней результаты реакции учитывают с использованием инвертированного микроскопа.
- iii) Лункам присваивают баллы по степени наблюдаемого ЦПЭ. Образец считают положительным, если степень торможения ЦПЭ составляет от 75 до 100% при наименьшем разведении (1/10). Титр сыворотки представляет собой наивысшее разведение сыворотки, которое способно снижать степень ЦПЭ в клеточной культуре на 75% и более.

2.3. Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК) является чувствительным и специфичным методом диагностики ЭГБ, и вплоть до 1980 года данный метод использовали для постановки диагноза и сертификации животных на экспорт. РСК также позволяет определять серогруппу возбудителя, и при своей относительно невысокой стоимости она обладает чувствительностью, схожей с таковой реакции вируснейтрализации и иммунодиффузии в агаровом геле. РСК способна детектировать и измерять уровень антител через 4-12 месяцев после заражения вирусом ЭГБ, однако, после этого периода надежность результатов снижается (Pearson *et al.*, 1992). РСК особенно эффективна для обнаружения недавнего заражения вирусом ЭГБ, но не более поздних случаев инфицирования.

2.4. Иммунодиффузия в агаровом геле

Реакцию иммунодиффузии в агаровом геле широко применяли для детекции антител к вирусу ЭГБ в сыворотках от инфицированных животных (Dubay *et al.*, 2004). В прошлом этот тест использовали для целей торговли животными. Данный тест отличается простотой и экономичностью, при этом антиген, необходимый для проведения реакции, относительно легко получить. Однако недостатком реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) является ее недостаточная специфичность:

она не позволяет дифференцировать вирус ЭГБ и вирус блутанга. Таким образом, сыворотки, положительные в РИД, следует повторно тестировать с использованием реакции, позволяющей определить серогрупповую принадлежность, по крайней мере, в тех регионах, в которых могут циркулировать оба вируса. Кроме того, хотя данный метод и относится к полуколичественным, его результат регистрируют только как положительный или отрицательный. РИД позволяет обнаруживать антитела в период с 5-15 дня после заражения и в течение 2 и более лет после этого (Pearson *et al.*, 1992).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

В качестве меры контроля заболевания в США разработаны вакцины, предназначенные для применения у содержащихся в неволе диких северных оленей, а в Японии для КРС. Учитывая, что кроме этих двух вакцин других подобных препаратов пока не существует, можно сказать, что лаборатории и производители вакцин проявляют мало интереса к разработке вакцин для контроля заболевания или циркуляции вируса ЭГБ. В Северной Америке разработаны аутологичные инактивированные вакцины на основе изолятов вируса ЭГБ, выделенных у больных или павших животных в неблагополучных хозяйствах. Для применения таких вакцин необходимо получить разрешение в регуляторных органах. Перед выпуском в продажу вакцины тестируют на чистоту и безопасность. Из соображений рентабельности испытания на эффективность аутологичных вакцин не проводят. Большинство потребителей – оленеводы. Поскольку вакцина содержит инактивированный вирус, для стимуляции иммунитета обычно требуются две дозы, которые вводят с интервалом в 2-4 недели, а для поддержания необходимого уровня иммунитета – ежегодные бустерные иммунизации.

В Японии большинство модифицированных и инактивированных вакцин разработано с целью контроля болезни Ибараки. После вспышек в 1980-х годах применяли живую аттенуированную вакцину на основе штамма Ибараки-2, которая подтверждала свою эффективность и безопасность вплоть до 1997 года (Ohashi *et al.*, 1999). Вакцина предназначена для однократного введения подкожным способом во время сезона низкой активности переносчика. В ходе выполнения Национальной программы надзора данного заболевания и интенсивного мониторинга годовалых бычков как индикаторных животных в течение нескольких лет случаев заражения болезнью Ибараки или антител к ее возбудителю не выявляли вплоть до 1997 года, когда были зарегистрированы новые случаи заражения (Ohashi *et al.*, 1999). Следует обратить внимание, что во время вспышки 1997 года наблюдались аборты и мертворождения – клинические признаки, не отмечавшиеся во время более ранних вспышек данного заболевания. Инактивированная вакцина содержит вирусы эфемерной лихорадки КРС и болезни Ибараки, выращенные в клеточных культурах и инактивированные формалином, с добавлением геля гидроксида алюминия в качестве адъюванта. В Японии обе вакцины применяют на добровольной основе в зависимости от эпизоотологической ситуации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ANTHONY S.J., MAAN S., MAAN N., KGOSANA L., BACHANEK-BANKOWSKA K., BATTEN C., DARPEL K.E., SUTTON G., ATTOUI H. & MERTENS P.P.C. (2009). Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): Comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup. *Virus Res.*, 145, 200–210.
- ANTHONY S.J., DARPEL K.E., MAAN S., SUTTON G., ATTOUI H. & MERTENS P.P.C. (2010). The evolution of two homologues of the core protein VP6 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV), which correspond to the geographical origin of the virus. *Virus Res.*, 145, 211–219.
- ARADAIB I.E., SAWYER M.M. & OSBURN B.I. (1994). Experimental epizootic hemorrhagic disease virus infection in calves: virologic and serologic studies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6, 489–491.
- ARADAIB I.E., MOHAMED M.E.H., ABDALLA M.A., KARRAR A.E., MAJID A.A., OMER R.A., ELAMIN S.M.M., SALIH M.M. & IDRESS S.H. (2003). Simultaneous detection and identification of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 1 and 2 using a multiplex RT PCR. *J. Anim. Vet. Adv.*, 2, 585–589.
- BATTEN C.A., EDWARDS L., BIN-TARIF A., HENSTOCK M.R. & OURA C.A. (2011). Infection kinetics of epizootic haemorrhagic disease virus serotype 6 in Holstein-Friesian cattle. *Vet. Microbiol.*, 154 (1–2), 23–28.
- BATTEN C.A., HENSTOCK M.R., BIN-TARIF A., STEEDMAN H.M., WADDINGTON S., EDWARDS L. & OURA C.A. (2012). Bluetongue virus serotype 26: infection kinetics and pathogenesis in Dorset Poll sheep. (2012). *Vet. Microbiol.*, 157 (1–2), 119–124.
- BELHOUCHE M., MOHD JAAFAR F., FIRTH A.E., GRIMES J.M., MERTENS P.P. & ATTOUI H. (2011). Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. *PloS one*. 6:e25697.
- BREARD E., SAILLEAU C., HAMBLIN C., GRAHAM S.D., GOURREAU J.M. & ZIENTARA S. (2004). Outbreak of epizootic haemorrhagic disease on the island of La Réunion. *Vet. Rec.*, 155 (14), 422–423.
- BRODIE S.J., BARDSLEY K.D., DIEM K., MECHAM J.O., NORELIUS S.E. & WILSON W.C. (1998). Epizootic hemorrhagic disease: analysis of tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals widespread orbivirus infection at low copy numbers. *J. Virol.*, 72, 3863–3871.
- CARPENTER S., MELLOR P.S. & TORR S.J. (2008). Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the UK and northwestern Palearctic. *Med. Vet. Entomol.*, 22, 175–187.
- CLAVIJO A., SUN F., LESTER T., JAPERSON T.L. & WILSON W.C. (2010). An improved real time reverse transcription polymerase chain reaction for the simultaneous detection of all serotypes of epizootic hemorrhagic disease virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 22, 588–593.
- DUBAY S.A., DEVOS J.C., NOON T.H. & BOE S. (2004). Epizootiology of hemorrhagic disease in mule deer in central Arizona. *J. Wildl. Dis.*, 40, 119–124.
- ESCHBAUMER M., WERNIKE K., BATTEN C.A., SAVINI G., EDWARDS L., DI GENNARO A., TEODORI L., OURA C.A., BEER M. & HOFFMANN B. (2012). Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 in European cattle and sheep: diagnostic considerations and effect of previous BTV exposure. *Vet. Microbiol.*, 159 (3–4), 298–306.
- GARD G.P. & MELVILLE L.F. (1992). Results of a decade's monitoring for orbiviruses in sentinel cattle pastured in an area of regular arbovirus activity in northern Australia. *In:*

- Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 85–89.
- GARD G.P., MELVILLE L.F. & SHORTHOSE J.E. (1989). Investigations of bluetongue and other arboviruses in the blood and semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.*, 20, 315.
- LUO L.Z. & SABARA M.I. (2005). Production of a recombinant major inner capsid protein for serological detection of epizootic hemorrhagic disease virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12, 904–909.
- MAAN N.S., MAAN S., NOMIKOU K., JOHNSON D.J., EL HARRAK M., MADANI H., YADIN H., INCOGLU S., YESILBAG K., ALLISON A.B., STALLKNECHT D.E., BATTEN C., ANTHONY S.J. & MERTENS P.P.C. (2010). RT-PCR assays for seven serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus & their use to type strains from the Mediterranean region and North America. *PLoS One*, 5, e12782.
- MACLACHLAN N.J. & OSBURN B.I. (2004). Epizootic haemorrhagic disease of deer. *In: Infectious Diseases of Livestock, Volume 2, Second Edition*, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, 1227–1230.
- MECHAM J.O. & JOCHIM M.M. (2000). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to epizootic hemorrhagic disease of deer virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 142–145.
- MECHAM J.O. & WILSON W.C. (2004). Antigen capture competitive enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed antigens for diagnosis of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 518–523.
- MELLOR P.S., CARPENTER S., HARRUP L., BAYLIS M. & MERTENS P.P.C. (2008). Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006. *Prev. Vet. Med.*, 87, 4–20.
- NOON T.H., WESCHE S.L., HEFFELFINGER J., FULLER A., BRADLEY G.A. & REGGIARDO C. (2002). Hemorrhagic disease in deer in Arizona. *J. Wildl. Dis.*, 38, 177–181.
- OHASHI S., YOSHIDA K., WATANABE Y. & TSUDA T. (1999). Identification and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3800–3803.
- PEARSON J.E., GUSTAFSON G.A., SHAFER A.L. & ALSTAD A.D. (1992). *In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 533–546.
- QUIST C.F., HOWERTH E.W., STALLKNECHT D.E., BROWN J., PISELL T. & NETTLES V.F. (1997). Host defense responses associated with experimental hemorrhagic disease in white-tailed deer. *J. Wildlife Dis.*, 33, 584–599.
- SAIF L.J. (2011). Reoviridae. *In: Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition*, MacLachlan N.J. & Dubovi E.J., eds. Academic Press, London, UK.
- SAVINI G., AFONSO A., MELLOR P., ARADAIB I., YADIN H., SANAA M., WILSON W., MONACO F. & DOMINGO M. (2011). Epizootic haemorrhagic disease. *Res. Vet. Sci.*, 91 (1), 1–17.
- SCHWARTZ-CORNIL I., MERTENS P.P., CONTRERAS V., HEMATI B., PASCALE F., BREARD E., MELLOR P.S., MACLACHLAN N.J. & ZIENTARA S. (2008). Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.*, 39, 46.
- STALLKNECHT D.E. & HOWERTH E.W. (2004). Epidemiology of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife: surveillance methods. *Vet. Ital.*, 40, 203–207.

ST GEORGE T.D., CYBINSKI D.H., STANDFAST H.A., GARD G.P. & DELLA-PORTA A.J. (1983). The isolation of five different viruses of the epizootic haemorrhagic disease of deer serogroup. *Aust. Vet. J.*, 60, 216–217.

TEMIZEL E.M., YESILBAG K., BATTEN C., SENTURK S., MAAN N.S., CLEMENT-MERTENS P.P. & BATMAZ H. (2009). Epizootic hemorrhagic disease in cattle, western Turkey. *Emerg. Inf. Dis.*, 15, 317–319.

THEVASAGAYAM J.A., WELLBY M.P., MERTENS P.P.C., BURROUGHS J.N. & ANDERSON J. (1996). Detection and differentiation of epizootic haemorrhagic disease of deer and bluetongue viruses by serogroup specific sandwich ELISA. *J. Virol. Methods*, 56, 49–57.

WHITE J.R., BLACKSELL S.D., LUNT R.A. & GARD G.P. (1991). A monoclonal antibody blocking ELISA detects antibodies specific for epizootic haemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.*, 29, 237–250.

WILSON W.C. (1994). Development of a nested-PCR test based on sequence analysis of epizootic hemorrhagic disease viruses non-structural protein 1 (NS1). *Virus Res.*, 31, 357–365.

WILSON W.C., HINDSON B.J., O'HEARN E.S., HALL S.J., TELLEGREN-ROTH C., TORRES C., MECHAM J.O. & LENHOFF R.J. (2009). A multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serogroups. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21, 760–770.

YIN H., ZHANG H., SHI L., YANG S., ZHANG G., WANG S. & ZHANG J. (2010). Detection and quantitation of bluetongue virus serotypes by a TaqMan probe-based real-time RT-PCR and differentiation from epizootic hemorrhagic disease virus. *J. Virol. Methods*, 108, 237–241.

* *
*

NB: Существует Референтная лаборатория по эпизоотической геморрагической болезни (последний обновленный список см. в Таблице в Части 4 данного Руководства по наземным животным или на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/http://oie.int/>). По поводу получения дополнительной информации по соответствующим диагностическим тестам, реактивам и вакцинам следует обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.