

## СЕМЕЙСТВО ЛОШАДИНЫЕ

## ГЛАВА 3.5.1

**АФРИКАНСКАЯ ЧУМА ЛОШАДЕЙ (ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗЫВАЕМАЯ ВИРУСОМ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ ЛОШАДЕЙ)****РЕЗЮМЕ**

**Описание болезни:** Африканскую чуму лошадей (АЧЛ) – инфекционное, но не заразное заболевание, которое может поражать всех животных, принадлежащих к семейству лошадиных, вызывает орбивирус, принадлежащий к семейству *Reoviridae* и вызывающие изменения респираторной функции и функции кровообращения. АЧЛ передается по крайней мере двумя видами мокрецов (*Culicoides*). Описаны девять серотипов АЧЛ.

Все серотипы возбудителей АЧЛ встречаются в восточной и южной Африке. Серотипы 9, 4 и 2 обнаружены в Северной и Западной Африке, откуда они эпизодически распространяются в страны, окружающие Средиземное море. Примеры вспышек заболевания за пределами Африки включают: вспышку на Среднем Востоке (1959-1963), в Испании (серотип 9, 1966, серотип 4, 1987-1990) и Португалии (серотип 4, 1989).

Принципиально необходима лабораторная диагностика АЧЛ. Хотя заболевание сопровождается характерными клиническими признаками и поражениями, их можно спутать с другими заболеваниями лошадей.

Поскольку АЧЛ является вирусным заболеванием, диагностика АЧЛ может быть основана на идентификации инфекционного вируса, вирусной нуклеиновой кислоты, вирусных антигенов или специфических антител. Для обнаружения вируса АЧЛ (ВАЧЛ; АНСВ) и специфических антител адаптированы разнообразные лабораторные методы.

**Идентификация возбудителя:** Для того чтобы выбрать гомологичный серотип вакцины особенно важно выполнить идентификацию вируса и серотипирование, когда вспышки АЧЛ происходят за пределами энзоотические территории.

Вирус АЧЛ можно выделить из крови, полученной на ранней фебрильной стадии. Другими наиболее подходящими тканями, из которых может быть выделен вирус для диагностики заболевания, являются селезенка, легкие и лимфатические узлы, полученные при вскрытии животного. Подготовленным образцом можно инокулировать клеточные культуры, например, культуры клеток почки новорожденного хомяка-21 (ВНК-21), стабильной культуры клеток обезьяны (MS), клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) или клеток насекомых (КС), и также вводя внутривенно в куриные эмбрионы. Для быстрого обнаружения антигена ВАЧЛ в крови, тканях селезенки и надосадочной жидкости, полученной при осаждении инфицированных клеток, разработано несколько методов твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА). Также разработан метод идентификации РНК ВАЧЛ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией. Для определения серотипа изолятов вируса могут быть использованы типоспецифические серологические тесты, например, реакция нейтрализации вируса (НВ), с привлечением типоспецифической ПЦР с обратной транскрипцией или секвенирования.

**Серологические и другие реакции:** У выживших после природной инфекции лошадей через 8-12 дней после заражения образуются антитела к инфицировавшему серотипу ВАЧЛ. Эти антитела можно продемонстрировать несколькими серологическими методами, включая реакцию связывания комплемента, ИФА, иммуноблотинг и реакцию НВ. Последняя используется для серотипирования.

**Требования к вакцинам:** В настоящее время на рынке имеются серийные ослабленные (одновалентные и поливалентные) вакцины, предназначенные для введения лошадям, мулам и ослам. Выполняется экспериментальная оценка субъединичных вакцин.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Африканскую чуму лошадей (АЧЛ) (*Peste equina africana*, *Peste equine*), инфекционное, незаразное, передаваемое членистоногими заболевания животных, принадлежащих к семейству лошадиных, вызывает содержащий двухцепочечную РНК орбивирус, принадлежащий к семейству *Reoviridae*. Род *Orbivirus* включает также вирус блютанга и вирус эпизоотической геморрагической болезни, которые обладают сходными морфологическими и биохимическими свойствами и отличными от ВАЧЛ патологическими и антигенными свойствами и также другим спектром организмов-хозяев. При использовании реакции нейтрализации вируса были идентифицированы девять антигенно различимых серотипа ВАЧЛ; между серотипами 1 и 2, 3 и 7, 5 и 8 и 6 и 9 наблюдаются в разной степени выраженные перекрестные реакции, но перекрестные реакции с другими известными орбивирусами отсутствуют.

Вирион ВАЧЛ представляет собой лишенную оболочки структуру размером около 70 нм. Геном вируса АЧЛ (ВАЧЛ) состоит из 10 сегментов двухцепочечной РНК, кодирующих семь структурных белков (VP1-7), большинство из которых полностью секвенированы для определения серотипов ВАЧЛ 4, 6 и 9 (Roy *et al.*, 1991; Venter *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1998), и четыре неструктурных белка (NS1, NS2, NS3, NS3A) (Grubman & Lewis, 1992; Laviada *et al.*, 1993). Белки VP2 и VP5 образуют внешний капсид вириона, и белки VP3 и VP7 являются мажорными белками внутреннего капсида. Белки VP1, VP4 и VP6 являются минорными белками внутреннего капсида. Белки NS3 являются вторыми по степени вариабельности белками ВАЧЛ (Van Niekerk *et al.*, 2001): самым вариабельным является мажорный белок внешнего капсида, VP2. Этот белок VP2 определяет серотипы ВАЧЛ и вместе с белком VP5 является мишенью для вируснейтрализующей активности (Martinez-Torrescuadrada *et al.*, 2001). Передача вируса осуществляется не менее чем двумя полевыми переносчиками: *Culicoides imicola* и *C. bolitinos*.

АЧЛ является энзоотическим заболеванием в странах, расположенных к югу от Сахары, хотя периодически случаются вспышки АЧЛ в Северной Африке (1965, 1989-1990, 2007-2010), на Среднем Востоке (1959-1961) и в Европе (Испания: 1966, 1987-1990, и Португалия: 1989) (Sanchez-Vizcaino, 2004).

Существуют четыре классические клинические формы АЧЛ: легочная, сердечная, смешанная и лихорадочная. Молниеносная легочная форма наблюдается у полностью чувствительных животных, характеризуется коротким течением, составляющим лишь несколько часов, и высокой летальностью. У животных наблюдается расстройство дыхания, вытягивание головы и шеи, и профузная потливость. В терминальной стадии из ноздрей выходит пена. Сердечная, отечная форма имеет более подострое течение, летальность составляет 50%. Может наблюдаться выраженное опухание головы и шеи, распространяющиеся до грудной клетки. Характерным признаком является опухание надглазничной ямки, возможны отек и петехии конъюнктивы. Паралич пищевода может привести к аспирационной пневмонии; подъязычное кровоизлияние является неблагоприятным прогностическим признаком. Чаще всего наблюдается смешанная форма с острым течением, сочетающая признаки сердечной и легочной форм. Летальность может достигать 70%. Лихорадочная форма АЧЛ имеет легкое течение, ее часто упускают из виду,

и ей болеют устойчивые виды семейства лошадиных: зебры и ослы (Coetzer & Guthrie, 2005).

Заболевание имеет сезонный (позднее лето/осень) и циклический характер, большинство эпизоотий в южной Африке происходят в теплое время (Baylis *et al.*, 1999). Летальность при АЧЛ различается у разных видов семейства лошадиных и зависит также от штамма или серотипа вируса. Наиболее чувствительным к АЧЛ видом семейства лошадиных являются лошади, летальность которых составляет 50-95%, несколько ниже летальность мулов – приблизительно 50%. В энзоотических районах Африки наблюдается высокая устойчивость мулов к АЧЛ, имеющей у этих животных субклиническое течение. Однако в европейских и азиатских странах ослы умеренно чувствительны к АЧЛ, и летальность этих животных составляет 10%. Зебры тоже весьма устойчивы, у них не наблюдается клинических признаков, кроме лихорадки, и в течение длительного времени (до 40 дней) может сохраняться вирусемия.

Для постановки правильного и подтверждающего диагноза необходима лабораторная диагностика. Несмотря на типичные клинические признаки и поражения АЧЛ можно спутать с другими заболеваниями. Например, для предварительного диагноза достаточно обнаружить опухание надглазничной области, часто присутствующее у лошадей с подострой АЧЛ, в сочетании с соответствующим анамнезом. Другие признаки и поражения менее специфичны для АЧЛ, и необходимо исключить другие заболевания, включая энцефалоз лошадей, инфекционную анемию лошадей, инфекцию, вызванную вирусом Хендра, вирусный артериит лошадей, пироплазмоз и геморрагическую пурпуру (МЭБ, 2010).

В настоящее время на рынке имеются серийные ослабленные (одновалентные и поливалентные) вакцины, предназначенные для введения лошадям, мулам и ослам.

Нет никаких данных, указывающих на возможность инфицирования людей полевым штаммом ВАЧЛ, даже при контакте с животными, подвергшимися естественному или экспериментальному заражению, или при работе с вирусом в лаборатории. Работы в лаборатории следует проводить в соответствии с требованиями биобезопасности в боксе, предназначенном для анализа биорисков (см. главу 1.1.4 *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*).

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

*Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики африканской чумы лошадей и их цель*

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>						
<b>ОТ-ПЦР в реальном времени</b>	+	+++	+	+++	++	-

<sup>1</sup> Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

<b>ОТ-ПЦР в агарозном геле</b>	-	+	+	++	+	-
<b>Выделение вируса</b>	-	++	-	+++	-	-
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
<b>Твердофазный ИФА (для отдельных серологических групп, основанный на VP7)</b>	+++	++	++	++	+++	++
<b>РСК</b>	+	+	+	+	+	+
<b>НВ</b>	+	+	-	+	+	+++

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами; – = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; Твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ;

РСК = реакция связывания комплемента; НВ = нейтрализация вируса

В настоящее время существует несколько методов идентификации вируса АЧЛ, от твердофазного иммуноферментного анализа (прямого или сэндвич-метода) с быстрой фиксацией с использованием поликлональных (Pab) или моноклональных антител (Mab), до полимеразной цепной реакции (ПЦР), включая ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ) для различения девять серотипов ВАЧЛ или вируса, выделенного из клеточной культуры. В некоторых случаях возможно использование нескольких методов для диагностики вируса при вспышке АЧЛ, особенно, источников заболевания. Вначале может быть проведен быстрый тест, например, твердофазный ИФА или ПЦР, с последующим выделением вируса в культуре ткани. При возникновении вспышки заболевания реакцию нейтрализации вируса (НВ) для идентификации серотипа, типоспецифическую ОТ-ПЦР или секвенирование следует выполнить как можно раньше, чтобы идентифицировать серотип и выбрать правильную вакцину.

В настоящее время отсутствуют международные стандарты вирусов и диагностических реактивов и также стандартная методология идентификации ВАЧЛ. Однако выполнена оценка панели вирусов и антител, и в разных лабораториях, включая Справочную лабораторию Европейского союза (ЕС) по АЧЛ, выполнены сравнительные исследования применения различных модификаций твердофазного ИФА для определения антигенов и антител ВАЧЛ. Результаты продемонстрировали высокую корреляцию результатов определения антигенов и антител при использовании внутренних методов компании и коммерческих наборов. Аналогичные результаты сравнения нескольких методов ОТ-ПЦР также продемонстрировали высокий уровень корреляции результатов. Дополнительную информацию о сравнительных исследованиях различных методов анализов и диагностических наборов можно получить в Справочной лаборатории Всемирной организации по охране здоровья животных (МЭБ). Очень важным аспектом диагностики является выбор образцов и их сохранная транспортировка в лабораторию.

## **1. Идентификация возбудителя**

### **1.1. Выделение вируса**

Предпочтительными образцами для диагностики являются несвернувшаяся цельная кровь, полученная на ранней фебрильной стадии заболевания у больных животных, и также небольшие фрагменты (2-4 г) селезенки, легкого и лимфатических узлов мертвых животных. При транспортировке и краткосрочном хранении, предшествующих обработке, температуру образцов следует поддерживать на уровне 4°C.

### **1.1.1. Культура клеток**

Выполнено успешное прямое выделение ВАЧЛ из клеточных линий млекопитающих: клеток почки новорожденного хомяка (ВНК-21), стабильной культуры клеток обезьяны (MS), клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) и клеточных линий насекомых *Culicoides* и комаров. В качестве инокулята можно использовать образцы крови, полученные в сосуды с надлежащим антикоагулянтом. После 15-60-минутной адсорбции при температуре окружающей среды или при 37°C культуры клеток промывают и добавляют стабилизирующую среду. Альтернативный и более распространенный способ заключается в промывании, лизировании и разбавлении крови в соотношении 1/10. Эта методика позволяет удалить нежелательные антитела, способные нейтрализовать свободный вирус, и способствуют выходу вируса, ассоциированного с мембранами эритроцитов. При использовании образцов тканей, например, селезенки, легкого и т.д., готовят 10% суспензии ткани в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) или среде для культивирования клеток с добавлением антибиотиков.

В клетках млекопитающих цитопатический эффект (ЦПЭ) может проявиться через 2-10 дней после инфекции. Перед тем, как будет сделано заключение о негативности образцов, следует выполнить три слепых пассажа. В клетках насекомых ЦПЭ не наблюдается, но через 5-7 дней можно обнаружить присутствие вируса в надосадочной жидкости методом ОТ-ПЦР в реальном времени. После этого надосадочную жидкость от инфицированных клеток насекомых пересеивают на клетки млекопитающих, на которых ЦПЭ будет продемонстрирован через 1 или 2 пассажа.

## **1.2. Методы, основанные на анализе нуклеиновых кислот**

### **1.2.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией**

ОТ-ПЦР – высокочувствительный метод, обеспечивающий быструю идентификацию нуклеиновой кислоты вируса АЧЛ в крови и других тканях инфицированных животных. Этот метод существенно улучшил лабораторную диагностику АЧЛ за счет повышения чувствительности обнаружения вируса и сокращения времени, требуемого для диагностики. Метод ОТ-ПЦР обнаруживает вирус-специфическую нуклеиновую кислоту после того, как вирус утратит жизнеспособность и способность вызывать новую инфекцию в клетках насекомых и млекопитающих. Таким образом, положительные результаты не обязательно указывают на присутствие инфекционного вируса.

Описано несколько методов ОТ-ПЦР в агарозном геле, применяемых для специфичного обнаружения РНК ВАЧЛ, мишенью которых являются вирусные сегменты 3, 7 или 8 (Aradaib, 2009; Bremer *et al.*, 1998; Laviada *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1994; Stone-Marschat *et al.*, 1994; Zientara *et al.*, 1994). Наиболее широко используемая методика предусматривает использованием праймеров, соответствующих 5'-концу (нуклеотиды 1-21) и 3'-концу (нуклеотиды 1160-1179) 7-го сегмента РНК (кодирующего белок VP7) с амплификацией полного сегмента вируса (Zientara *et al.*, 1994).

Для высоко чувствительного и специфичного обнаружения РНК ВАЧЛ разработаны методы ОТ-ПЦР в реальном времени, основанные на использовании пары праймеров и меченного зонда из консервативных последовательностей сегментов вируса 3, 5 или 7 (Agüero *et al.*, 2008; Bachanek-Bankowska *et al.*, 2014; Fernandez-Pinero *et al.*, 2009; Rodriguez-

Sanchez *et al.*, 2008). Также описана дуплексная ОТ-ПЦР в реальном времени, направленная на сегменты 7 и 8 вирусного генома (кодирующая фрагменты NS1 и NS2, соответственно) (Quan *et al.*, 2010).

Хотя референтные штаммы девяти вирусных серотипов можно обнаружить при использовании обоих методов ОТ-ПЦР – в геле и в реальном времени, преимущества ОТ-ПЦР в реальном времени над ОТ-ПЦР в агарозном геле заключаются в более быстром анализе, более высокой чувствительности и возможности автоматизации этого метода, сопровождающейся повышением его производительности. Тем не менее, методы ОТ-ПЦР в геле, в особенности с амплификацией длинных фрагментов РНК (Laviada *et al.*, 1997; Zientara *et al.*, 1994), могут быть очень полезными для более глубокого определения генетических характеристик вируса за счет секвенирования ампликонов. Кроме того, эта разновидность ОТ-ПЦР может быть полезной в лабораториях, не располагающих возможностями выполнения ОТ-ПЦР в реальном времени.

2015 г. Справочная лаборатория МЭБ по АЧЛ провела международное исследование, для того чтобы собрать информацию об эффективности разных методов, используемых в основных диагностических лабораториях, работающих с ВАЧЛ. В рамках исследования была выполнена оценка 10 разных протоколов ОТ-ПЦР. Хотя при проведении этого исследования некоторые методы можно было протестировать лишь в одной или двух лабораториях, для них были получены очень хорошие результаты, и поэтому эти методы подходят для дальнейшей оценки и валидации. Исследование показало, что методы ОТ-ПЦР, разработанные Agüero *et al* (2008) и Guthrie *et al.* (2013), обеспечили правильное обнаружение всех репрезентативных штаммов, включенных в международное исследование, при высокой чувствительности анализа полевых образцов. Эти методы валидированы для сертификации отдельных животных перед перемещением и описаны ниже.

Ниже подробно описаны методы ОТ-ПЦР ВАЧЛ в геле и ОТ-ПЦР ВАЧЛ в реальном времени.

Для того чтобы обеспечить эффективный анализ методом ПЦР необходимо экстрагировать из образца РНК ВАЧЛ высокого качества. Для экстракции нуклеиновых кислот из клинических образцов могут быть использованы разнообразные коммерческие и применяемые в отдельных лабораториях методы.

### **1.2.2. Методика ОТ-ПЦР в агарозном геле (Laviada *et al.*, 1997; Zientara *et al.*, 1994)**

Денатурацию экстрагированной РНК следует выполнить до процедуры ОТ-ПЦР, поскольку геном ВАЧЛ представляет собой двухцепочечную РНК. Используются праймеры для ПЦР с последовательностью 5'-GTT-AAA-ATT-CGG-TTA-GGA-TG-3', соответствующей ориентации информационной РНК (иРНК), и последовательностью 5'-GTA-AGT-GTA-TTC-GGT-ATT-G-3', комплементарной ориентации иРНК.

Все компоненты, необходимые для обратной транскрипции и ПЦР, вносят в пробирку с денатурированной РНК. Одностадийную ОТ-ПЦР выполняют посредством инкубации в амплификаторе, включающей: от 45 минут до 1 часа при 37-55°C, 5-10 минут при 95°C, затем 40 циклов, соответствующих следующему описанию: 94-95°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1-1,5 минуты, 70-72°C в течение 2-2,5 минуты, с последующей стадией конечной элонгации, продолжающейся 7-9 минут при 70-72°C. Для анализа продуктов ПЦР применяется электрофорез в агарозном геле. АЧЛ-позитивные образцы образуют полосу, соответствующую фрагменту из 1179 пар оснований, который может быть использован в

качестве матрицы при секвенирующей реакции, с независимым использованием праймеров для ПЦР для получения нуклеотидной последовательности 7-го сегмента вирусного генома.

### **1.2.3. Методика ОТ-ПЦР в реальном времени (Agüero *et al.*, 2008)**

Эта группоспецифическая методика ОТ-ПЦР применялась с хорошими результатами участвовавшими в исследовании национальными справочными лабораториями стран-членов ЕС при аттестационных испытаниях в период с 2009 г. по 2015 г. Кроме того, в международном исследовании, организованном в 2015 г. под эгидой сети Справочных лабораторий МЭБ, этот протокол занял одну из верхних позиций рейтинга.

#### **а) Протокол**

При проведении этого анализа, описанного Agüero *et al.* (2008), мишенью является 7-й сегмент генома ВАЧЛ (VP7). Метод позволяет обнаруживать все известные типы ВАЧЛ и циркулирующие в настоящее время штаммы.

##### **i) Экстракция РНК из образцов крови и тканей**

Широко доступны коммерческие наборы; стадия экстракции РНК может быть выполнена в соответствии с методиками, прилагаемыми к каждому набору.

ii) На рынке присутствуют несколько наборов для одностадийной ОТ-ПЦР в реальном времени, которые могут быть использованы с учетом локальных или соответствующих отдельным случаям требований, используемого набора и имеющегося оборудования. Ниже перечислены основные этапы, в соответствии с описанием в публикации Agüero *et al.* (2008) (последовательности праймеров и зондов представлены в Таблице 2).

iii) Исходный концентрированный праймер разбавляют до рабочей концентрации 8 мкМ, тогда как зонд разбавляют до рабочей концентрации 50 мкМ.

iv) По 2,5 мкл исходного раствора каждого праймера в рабочей концентрации 8 мкМ (конечная концентрация 1 мкМ) вносят в каждую лунку планшета для ПЦР (или пробирку, или стрип), в которой будут находиться образцы РНК, положительные или отрицательные контрольные образцы. Планшет должен находиться во льду.

v) В каждую лунку добавляют по 2 мкл образцов РНК, включая положительные и отрицательные контрольные образцы.

vi) Образцы подвергают термической денатурации при 95°C в течение 5 минут с последующим быстрым охлаждением во льду в течение следующих 5 минут.

vii) Следуя инструкциям производителя, готовят требуемый объем мастер-микса (общей реакционной смеси) для одностадийной ОТ-ПЦР в реальном времени, исходя из количества тестируемых образцов. Конечная концентрация зонда должна составлять 0,25 мкМ (0,1 мкл исходного зонда в рабочей концентрации, по 50 мкМ на образец).

viii) В каждую лунку планшета для ПЦР, содержащую денатурированные праймеры и РНК, вносят по 13 мкл мастер-микса.

ix) Планшет помещают в амплификатор с детекцией в реальном времени, запрограммированный следующим образом:

48°C x 25 минут

95°C x 10 минут

40 циклов: 95°C x 15 секунд, 55°C x 35 секунд, 72°C x 30 секунд

Если используемые реактивы и амплификатор обеспечивают возможность быстрой амплификации, можно использовать следующую программу  
48°C x 25 минут  
95°C x 10 минут  
40 циклов: 97°C x 2 секунды, 55°C x 30 секунд  
В конце стадии при 55°C регистрируют данные флуоресценции.

**Примечание:** значения времени и температур могут варьировать, и их следует оптимизировать для используемых реактивов или набора.

#### **в) Интерпретация результатов**

Результаты анализа недостоверны, если получены атипичные кривые амплификации. В этом случае анализ следует повторить.

Результат анализа положительный, если получена типичная кривая амплификации, и полученное для 40 циклов ПЦР значение  $C_t$  (количество циклов полимеразной цепной реакции (ПЦР), требуемых для того, чтобы флуоресцентный сигнал превысил фоновый уровень), меньше или равно заданному порогу  $C_t$  ( $C_t \leq 35$ ).

Результат анализа неинформативный, если получена типичная кривая амплификации, и полученное для 40 циклов ПЦР значение  $C_t$  превышает заданное пороговое значение  $C_t$  (35) ( $C_t \geq 35$ ).

Результат анализа отрицательный, если для 40 циклов ПЦР получена горизонтальная кривая амплификации, не пересекающая пороговую линию.

#### **с) Диагностические характеристики**

##### **i) Определение пороговых значений**

Положительное пороговое значение для данного метода составляет менее 35 циклов ПЦР ( $C_t \leq 35$ ).

Отрицательное пороговое значение для данного метода составляет 40 циклов ПЦР.

Результаты анализа между положительным и отрицательным пороговыми значениями (35 и 40 циклов ПЦР) считаются неинформативными ( $35 \leq C_t \leq 40$ ).

##### **ii) Диагностическая чувствительность и специфичность**

Диагностическая специфичность (ДС) и диагностическую чувствительность (ДЧ) рассчитывали в соответствии с методикой, подробно описанной в главе 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических наборов для анализа инфекционных заболеваний*.

Для того чтобы оценить ДС и ДЧ описанного Agüero метода ПЦР-ОТ в реальном времени, были проанализированы 186 отрицательных и 132 положительных образца, что превосходит минимальные требования (73) к оценке ДС и ДЧ, допускающие 95% чувствительность и точность при 5% ошибки. ДЧ и ДС составили 97% и 100%, соответственно. Таким образом, можно заключить, что количество образцов с известным статусом, использованных для расчета этих диагностических параметров, было достаточным для соответствия требованиям МЭБ.

#### **d) Воспроизводимость**



Воспроизводимость описанного Agüero метода ОТ-ПЦР в реальном времени, изученного в вышеупомянутом международном исследовании, составила не менее 93,55%; метод обеспечил правильную идентификацию всех включенных в панель положительных и отрицательных контрольных образцов. Во всех лабораториях были обнаружены положительные образцы в разведениях не ниже  $10^{-5}$ . Аналогичные результаты были получены и в других аттестационных программах.

Референтные штаммы инактивированного вируса с серотипами 1-9 для внедрения и применения метода ОТ-ПЦР можно приобрести в Справочной лаборатории МЭБ, которая находится в Испании.

#### **1.2.4. Методика ОТ-ПЦР в реальном времени (Guthrie *et al.*, 2013)**

##### **а) Протокол**

Представленный в этом документе метод представляет собой адаптированный метод Guthrie *et al.* (2013) и обеспечивает обнаружение всех известных типов и циркулирующих штаммов ВАЧЛ. Мишенью данного метода является 7-й сегмент генома ВАЧЛ (VP7). Описанную ниже методику может потребоваться модифицировать, для того чтобы она удовлетворяла требования лаборатории или различных наборов для ОТ-ПЦР.

##### **i) Экстракция РНК из образцов крови и ткани**

Широко доступны коммерческие наборы; стадия экстракции РНК может быть выполнена в соответствии с методиками, прилагаемыми к каждому набору.

ii) На рынке присутствуют наборы для одностадийной ОТ-ПЦР в реальном времени. Ниже перечислены основные этапы, в соответствии с описанием в публикации Guthrie *et al.* (2013), которые могут быть модифицированы с учетом локальных или соответствующих отдельным случаям требований, используемого набора и имеющегося оборудования.

iii) Готовят исходные растворы смеси праймеров и зонда с 25-кратной концентрацией, составляющей 5 мкМ для прямого и обратного праймеров и 3 мкМ для зонда.

iv) В соответствующие лунки планшета для ПЦР (или пробирки, или стрипы) вносят по 5 мкл образцов РНК, включая исследуемые, положительные и отрицательные контрольные образцы.

v) Образцы подвергают термической денатурации при 95°C в течение 2 минут, и охлаждают во льду в течение по крайней мере 3 минут.

vi) Следуя инструкциям производителя, готовят требуемый объем мастер-микса (общей реакционной смеси) для одностадийной ОТ-ПЦР в реальном времени, исходя из количества образцов крови и ткани. В мастер-микс вносят 1 мкл исходного раствора смеси праймеров и зонда с 25-кратной концентрацией (приготовленной в п. iii), чтобы в каждой лунке конечная концентрация каждого праймера составила 200 нМ и концентрация зонда 120 нМ.

vii) В каждую лунку планшета для ПЦР, содержащую денатурированную РНК, вносят по 20 мкл мастер-микса.

viii) Планшет помещают в амплификатор с детекцией в реальном времени, запрограммированный для обратной транскрипции и амплификации к ДНК или флуоресцентной детекции, в соответствии с инструкциями производителя.

Приводится пример температурного профиля:

48°C течение 10 минут

95°C в течение 10 минут

40 циклов: 95°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 45 секунд

Примечание: значения времени и температур могут варьировать, и их следует оптимизировать для используемых реактивов или набора

#### **b) Интерпретация результатов**

Образцы классифицируют как «положительные по ВАЧЛ», если во всех повторностях образца в 36 циклах ПЦР нормализованная флуоресценция при анализе ВАЧЛ методом ОТ-ПЦР в реальном времени превышает 0,1 порогового значения.

Образцы классифицируют как «неинформативные по ВАЧЛ», если в любой повторности образца нормализованная флуоресценция при анализе ВАЧЛ методом ОТ-ПЦР в реальном времени превышает 0,1 порогового значения в 36-40 циклах ПЦР.

Образцы классифицируют как «отрицательные по ВАЧЛ», если во всех повторностях образца нормализованная флуоресценция не превышает 0,1 порогового значения в 40 циклах ПЦР, и если нормализованная флуоресценция при анализе внутреннего положительного контрольного образца превышает 0,1 порогового значения в 33 циклах ПЦР

Заключение о том, что в образцах «нуклеиновая кислота ВАЧЛ не обнаружена» делают, если во всех повторностях образца нормализованная флуоресценция при анализе ВАЧЛ не превышает 0,1 порогового значения в 40 циклах ПЦР, и если при анализе внутреннего положительного контрольного образца нормализованная флуоресценция не превышает 0,1 порогового значения в 33 циклах ПЦР.

#### **c) Диагностические характеристики**

##### **i) Определение пороговых значений**

Положительное пороговое значение для данного метода составляет менее 36 циклов ПЦР.

Отрицательное пороговое значение для данного метода составляет 40 циклов ПЦР.

Результаты анализа между положительным и отрицательным пороговыми значениями (36 и 40 циклов ПЦР) считаются неинформативными.

##### **ii) Диагностическая чувствительность и специфичность**

Оценка ДЧ и ДС метода ОТ-ПЦР применительно к детекции нуклеиновой кислоты ВАЧЛ в реальном времени в образцах цельной крови была выполнена посредством сравнения с результатами выделения вируса при использовании Байесовской модели анализа латентных классов с двумя испытаниями и двумя совокупностями, допускающей условную зависимость (корреляцию) между результатами испытаний. 503 образца лошадиной крови, каждый из которых был получен у одного животного с пирексией и одним или несколькими типичными клиническими признаками АЧЛ, представляли собой образцы с потенциальной ВАЧЛ-инфекцией. Кроме того, были получены образцы крови из двух отдельных здоровых популяций лошадей (состоявших из 503 и 98 лошадей, соответственно), не вакцинированных против АЧЛ и с высокой вероятностью не подвергавшихся контактам с естественной ВАЧЛ-инфекцией; эти образцы представляли собой АЧЛ-негативные образцы.

Медиана диагностической специфичности метода анализа превысила 99,9%.

Медиана диагностической чувствительности метода анализа превысила 97,8%.

#### d) Воспроизводимость

В вышеупомянутом международном исследовании чувствительность и специфичность разработанного Guthrie метода ОТ-ПЦР в реальном времени с зондом FRET составили 88,1% и 100%, соответственно, что позволило идентифицировать все включенные в панель положительные и отрицательные образцы. Во всех лабораториях были обнаружены положительные образцы в разведениях не ниже  $10^{-5}$ .

**Таблица 2.** Сравнение методов ОТ-ПЦР в реальном времени, разработанных Agüero et al. (2008) и Guthrie et al. (2013)

	<b>Agüero et al., 2008</b>	<b>Guthrie et al., 2013</b>
<b>Мишень</b>	Группоспецифичная (VP7)	Группоспецифичная (VP7)
<b>Праймеры (5'-3')</b>	ССА-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG	AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T
	СТА-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT	GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA
<b>Зонд (5'-3')</b>	FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-ССА-СТА-MGB	FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB
<b>Температура отжига</b>	55°C	60°C
<b>Количество циклов амплификации</b>	40	40
<b>Аналитическая чувствительность (ПО)</b>	Разведение $10^{-5}$ вирусной суспензии референтного штамма ВАЧЛ-4 с титром $10^{6,3}$ ЦПД <sub>50</sub> /мл, что соответствует, Ct = $34,3 \pm 0,5$ ( $10^{1,3}$ ЦПД <sub>50</sub> /мл)	Разведение $3,02 \times 10^{-6}$ ВАЧЛ-положительных образцов крови, что соответствует Ct = 35,71
<b>Диагностическая специфичность</b>	100%	99,9%.
<b>Диагностическая чувствительность</b>	97%	97,8%.

### 1.3. Типирование ВАЧЛ

До недавнего времени реакции нейтрализации вируса являлась наиболее предпочтительным методом типирования и также «золотым стандартом» идентификации ВАЧЛ, выделенного из полевых образцов при использовании типоспецифической антисыворотки (Verwoerd, 1979). Для получения результатов с помощью этого метода требуется не менее 5 суток. В результате разработки типоспецифичной ОТ-ПЦР в геле (Maan et al., 2011; Sailleau et al., 2000) и ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием гибридизационных зондов (Koekemoer, 2008), мишенью которых является Seg-2 ВАЧЛ для идентификации и различения генотипов ВАЧЛ, был получен метод, позволяющий быстро типировать ВАЧЛ в крови и образцах ткани. Эти методы могут быть использованы для значительного ускорения и повышения надежности детекции и идентификации (по сравнению с реакцией НВ) девяти серотипов ВАЧЛ. Недавно Bachanek-Bankowska et al., 2014, Weyer et al., 2015, разработали типоспецифичные анализы методом ОТ-ПЦР в реальном времени, основанные на использовании зондов Taqman-MGB.

Однако детекция всех генетических вариантов в пределах серотипа подобным методом осложняется тем, что со временем в геноме ВЧЛ, в частности, в области, кодирующей VP2, на основе которой конструируют специфичные праймеры/зонды для типирования, могут появиться генетические изменения. Поэтому несмотря на то, что молекулярные методы позволяют быстро типировать ВАЧЛ во многих положительных полевых образцах, в качестве золотого стандарта для серотипирования изолятов ВАЧЛ следует сохранить реакцию НВ.

## 2. Серологические исследования

В качестве методов детекции группореактивных антител к ВАЧЛ, особенно в крупномасштабных исследованиях, хорошо зарекомендовали себя непрямой и конкурентный блокирующий варианты твердофазного ИФА, предусматривающие использование либо растворимого антигена ВАЧЛ, либо рекомбинантного белка VP7 (Hamblin *et al.*, 1990; Laviada *et al.*, 1992; Maree & Paweska, 2005; Wade Evans *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 1998). Оба этих метода признаны Европейской комиссией (2002). Поскольку для конкурентного блокирующего твердофазного ИФА не требуется видоспецифичный антиглобулин, этот метод может быть использован также для тестирования образцов, полученных в дикой природе. Кроме того, для определения антител АЧЛ адаптирован метод иммуноблотинга (Laviada *et al.*, 1992), особенно удобный при небольшом количестве сывороток. Широко применяется реакция связывания комплемента (РСК), но некоторые сыворотки, особенно сыворотки осла и зебры, являются антикомплементарными

### **2.1. Блокирующий твердофазный иммуноферментный анализ**

Конкурентный блокирующий твердофазный ИФА позволяет обнаружить специфичные антитела к ВАЧЛ, присутствующие у любого животного, принадлежащего к семейству лошадиных. В молекулярной структуре ВАЧЛ основным белком, обладающим антигенной активностью, является VP7, сохраняющий консервативную последовательность у всех девяти серотипов ВАЧЛ. Этот метод анализа предусматривает использование моноклонального антитела к VP7, обеспечивающего высокую чувствительность и специфичность. Более того, этот метод позволяет проводить тестирование других видов семейства лошадиных (ослов, зебр и т.д.), тем самым предотвращая проблему специфичности, иногда возникающую при использовании непрямого варианта твердофазного ИФА. Высокий уровень безопасности обеспечивается использованием неинфекционного рекомбинантного антигена VP7 (Европейская комиссия, 2002).

Принцип данного метода заключается в блокировании специфичной реакции между рекомбинантным белком VP7, абсорбированным на планшете для твердофазного ИФА, и конъюгированным моноклональным антителом к белку VP7. Эту реакцию блокируют антитела ВАЧЛ, потенциально присутствующие в исследуемом образце сыворотки. Уменьшение интенсивности окраски указывает на присутствие антител к ВАЧЛ в образце сыворотки.

На рынке присутствуют диагностические наборы для конкурентного блокирующего ИФА.

#### **2.1.1. Методика**

i) *Твердая фаза:* В лунки 96-луночных планшетов для твердофазного ИФА для образования покрытия вносят по 50-100 нг рекомбинантного VP7 ВАЧЛ-4, разведения которого готовят с использованием карбонатно-бикарбонатного буферного раствора, рН 9,6. Планшеты инкубируют в течение ночи при 4°C.

ii) Планшеты троекратно промывают 0,1-кратным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), содержащим 0,135 М NaCl и 0,05% (отношение объемов) Твина 20 (промывающим раствором). Для удаления остаточного промывающего раствора осторожно постукивают перевернутым планшетом по абсорбирующему материалу.

iii) *Исследуемые образцы:* исследуемые образцы сыворотки и положительные и отрицательные контрольные образцы сыворотки (если производитель набора не предоставил готовые образцы контрольных сывороток) разводят в отношении 1/5 раствором для разведения, содержащим 0,35 М NaCl, 0,05% Твина 20 и 0,1% Катона, по 100 мкл в лунке. Инкубируют в течение 1 часа при 37°C.

iv) Планшеты 5-кратно промывают 0,1-кратным PBS, содержащим 0,135 М NaCl и 0,05% (отношение объемов) Твина 20 (промывающим раствором). Для удаления остаточного промывающего раствора осторожно постукивают перевернутым планшетом по абсорбирующему материалу.

v) *Конъюгат*: В лунки вносят по 100 мкл моноклонального антитела к VP7, конъюгированного с пероксидазой хрена. Данное антитело предварительно разводят в соотношении 1/5000-1/15000 раствором стабилизатора StabiliZyme Select® (SurModics. Код: SZ03) в дистиллированной воде (1/1). Инкубируют в течение 30 минут при 37°C.

vi) Планшеты промывают, как описано в п. iv.

vii) *Субстрат/хромоген*: В лунки добавляют по 100 мкл раствора субстрата/хромогена, т.е. 1 мл (2,2'-азино-ди-[3-этилбензотиазолин]- 6-сульфоновой кислоты; ABTS), 5 мг/мл + 9 мл субстратного буферного раствора (0,1 М фосфатно/цитратного буферного раствора, pH 4, содержащего 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре. Для того чтобы остановить развитие окраски, в каждую лунку добавляют по 100 мкл 2% (масса/объем) додецилсульфата натрия.

Могут быть использованы альтернативные хромогенные системы (например, на основе тетраметилбензидина).

vii) Планшеты сканируют при длине волны 405 нм.

ix) Интерпретация результатов: Процент блокировки (ПБ) в каждом образце определяют по следующей формуле:

$$\text{ПБ} = \frac{\text{Оптическая плотность (контроль -)} - \text{Оптическая плотность (иссл. образец)}}{\text{Оптическая плотность (контроль -)} - \text{Оптическая плотность (контроль +)}} \times 100$$

Образцы с БП ниже 45% классифицируют как отрицательные по антителам к ВАЧЛ (не содержащие антител).

Образцы с БП выше 50% классифицируют как положительные по антителам к ВАЧЛ (содержащие антитела).

Образцы с БП между 45% и 50% классифицируют как сомнительные, и должны быть протестированы повторно. В случае повторного получения сомнительного результата, следует через 2 недели получить новый образец и протестировать его.

## 2.2. Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ

Для высокочувствительного и высокоспецифичного определения антител к ВАЧЛ в качестве антигена<sup>2</sup> используют рекомбинантный белок VP7 (Laviada *et al.*, 1992; Maree & Paweska, 2005). Дополнительными достоинствами этого антигена являются стабильность и отсутствие инфекционности. Конъюгат, используемый для определения этим методом, представляет собой антилошадиный иммуноглобулин, конъюгированный с пероксидазой хрена, который реагирует с сыворотками лошадей, мулов и ослов. Метод, описанный Maree & Paweska (2005), предусматривает использование протеина G в качестве конъюгата, который тоже реагирует с сывороткой зебры.

### 2.2.1. Методика

<sup>2</sup> Этот антиген можно приобрести в Центре исследований здоровья животных (CISA), Испания. Сроки доставки: 4-6 месяцев.

i) *Твердая фаза*: В лунки 96-луночных планшетов для твердофазного ИФА для образования покрытия вносят рекомбинантный VP7 ВАЧЛ-4, разведения которого готовят с использованием карбонатно-бикарбонатного буферного раствора, pH 9,6. планшеты инкубируют в течение ночи при 4°C.

ii) Планшеты 5-кратно промывают дистиллированной водой, содержащей 0,01% (отношение объемов) Твина 20 (промывающим раствором). Для удаления остаточного промывающего раствора осторожно постукивают перевернутым планшетом по абсорбирующему материалу.

iii) Планшеты блокируют смесью фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), pH 7,2 и 5% (отношение массы к объему) обезжиренного молока, которую вносят по 200 мкл в каждую лунку с последующей инкубацией в течение 1 часа при 37°C.

iv) Удаляют блокирующий раствор и осторожно постукивают перевернутым планшетом по абсорбирующему материалу.

v) *Исследуемые образцы*: Готовят разведения образцов исследуемой сыворотки и также положительной и отрицательной контрольных сывороток в соотношении 1/25 смесью PBS + 5% (отношение массы к объему) обезжиренного молока + 0,05% (отношение объемов) Твина 20, по 100 мкл в каждой лунке. Планшет инкубируют в течение 1 часа при 37°C. Для титрования добавляют серию двукратных разведений из 1/25 (100 мкл/лунка), по одной сыворотке на столбец планшета, в двух повторностях (два столбца), и выполняют эти же действия в отношении положительных и отрицательных контрольных образцов. Планшет инкубируют в течение 1 часа при 37°C.

vi) Планшеты промывают, как описано в п. ii.

vii) *Конъюгат*: В лунки вносят по 100 мкл антилошадиного гамма-глобулина, конъюгированного с пероксидазой хрена и разведенного смесью PBS + 5% молока + 0,05% Твина 20, pH 7,2. Инкубируют в течение 30 минут при 37°C

viii) Планшеты промывают, как описано в п. ii.

ix) *Хромоген/субстрат*: В лунки добавляют по 200 мкл раствора субстрата/хромогена (10 мл 80,6 мМ [3-(диметиламино) бензойной кислоты; DМAB), + 10 мл 1,56 мМ [3-метил-2-бензотиазолинона гидразона; МВТН] + 5 мкл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Приблизительно через 5-10 минут (до начала окрашивания лунок с отрицательным контролем) в лунки добавляют по 50 мкл 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, для того чтобы остановить развитие окраски. Могут быть также использованы другие хромогены, например АВТS, тетраметилбензидин или ортофенилдиамин.

x) Планшеты сканируют на спектрофотометре при длине волны 600 нм (или 620 нм).

xi) *Интерпретация результатов*: Для расчета порогового значения прибавляют 0,06 к значению, полученному для отрицательного контрольного образца (0,06 – среднеквадратичное отклонение, полученное для группы из 30 отрицательных сывороток. Исследуемые образцы с оптической плотностью ниже порогового значения считают отрицательными. Исследуемые образцы с оптической плотностью выше порогового значения +0,15 считают положительными. Исследуемые образцы с промежуточными значениями оптической плотности считают сомнительными и для подтверждения результата используют второй метод анализа.

### 2.3. Связывание комплемента

Реакция связывания комплемента широко применялась в прошлом, но в настоящее время ее используют реже, и во многих лабораториях вместо нее в целях скрининга используют твердофазный ИФА. Учитывая более высокую чувствительность и степень стандартизации твердофазного ИФА и также значительное количество сывороток с антикомплемментарной активности, такая замена является прогрессивной. Тем не менее, в эндемических районах реакция СК является полезным инструментом для демонстрации и титрования группоспецифичных антител IgM кВАЧЛ, в особенности после недавнего инфицирования или вакцинации.

#### 2.3.1. Реактивы

- i) Забуференный вероналом физиологический раствор, содержащий 1% желатина (VBSG).
- ii) Не содержащие эритроцитов образцы сыворотки следует подвергнуть термоинактивации в течение 30 минут: лошадиную сыворотку при 56°C, сыворотку зебры при 60°C и сыворотку осла при 62°C.
- iii) Антиген представляет собой сахарозо/ацетоновый экстракт головного мозга ВАЧЛ-инфицированной мыши. В качестве контрольного антигена используют головной мозг неинфицированной мыши, экстрагированный таким же способом. Из-за отсутствия сыворотки, являющейся международным стандартом, антиген следует титровать локально приготовленной положительной контрольной сывороткой. Для проведения данной реакции используют от 4 до 8 единиц. Антиген можно также получить посредством инокуляции вирусом подходящей клеточной культуры (см. выше раздел В.1).
- iv) Комплементом является нормальная сыворотка морской свинки.
- v) Гемолизин представляет собой гипериммунную кроличью сыворотку к эритроцитам овцы (ЭО).
- vi) Эритроциты овцы получают при асептическом проколе яремной вены и хранят в растворе Олсвера<sup>3</sup> или растворе цитрата натрия.
- vii) Для приготовления гемолитической системы (ГС) гемолитин разбавляют до двух гемолитических доз и используют его для сенсibilизации отмытых ЭО. ЭО стандартизируют до концентрации 3%.
- viii) *Контрольная сыворотка:* Положительную контрольную сыворотку получают локально и валидируют. В качестве отрицательной контрольной сыворотки используют сыворотку, полученную от здоровой лошади и не содержащую антител к ВАЧЛ.

#### 2.3.2. Методика

- i) Реакцию проводят в 96-луночных круглодонных титрационных микропланшетах в конечном объеме 100 мкл/луночка или в пробирках, в случае использования макро-методики, в течение 18 часов при 4°C.
- ii) Все сыворотки, исследуемые и контрольные образцы разбавляют в соотношении 1/5 раствором VBSG, и добавляют по 25 мкл каждой сыворотки в двух повторностях. Готовят серию двукратных разведений каждой сыворотки от 1/5 до 1/180.

---

<sup>3</sup> 20,5 г декстрозы (114 мМ), 7,9 г цитрата натрия 2Н<sub>2</sub>O (27 мМ), 4,2 г NaCl (71 мМ), Н<sub>2</sub>O до 1 литра. Для коррекции рН используют 1М лимонную кислоту.

- iii) Добавляют 25 мкл антигена, разбавленного в соответствии с результатами выполненного ранее титрования.
- iv) Добавляют 25 мкл комплемента, разбавленного в соответствии с результатами выполненного ранее титрования.
- v) Инкубируют в течение 18 часов при 4°C.
- vi) Во все лунки титрационного микропланшета добавляют по 25 мкл ГС.
- vii) Планшет инкубируют в течение 30 минут при 37°C.
- viii) После этого планшеты центрифугируют при 200 g, и выполняют балльную оценку гемолиза в лунках. Используют контроль сывороток, комплемента, антигена и ГС.
- ix) Регистрируют результаты, используя 50% гемолиз в качестве конечной точки. Титром является величина, обратная самому высокому разведению сыворотки, специфично связывающему комплемент с антигеном СК.

## **2.4. Нейтрализация вируса (НВ)**

Для обнаружения серотип-специфических антител можно использовать реакцию нейтрализации вируса (House *et al.*, 1990). Реакция НВ приобретает дополнительную ценность при проведении эпидемиологических фармаконадзорных исследований и исследований передачи вируса, главным образом, в эндемичных районах, где с высокой вероятностью могут присутствовать многочисленные серотипы.

### **2.4.1. Методика реакции НВ**

- i) В 96-луночном плоскодонном титрационном микропланшете, предназначенном для культуры клеток, из начального разведения 1/5 готовят серийные двукратные разведения исследуемой сыворотки, используя для разведения среду для культивирования клеток. Для каждого образца при каждом разведении используют две лунки. В каждую серию испытаний следует также включить положительную и отрицательную контрольные сыворотки. В каждую лунку добавляют равный объем (например, 25 мкл) исходного ВАЧЛ, содержащего 100 TCID<sub>50</sub> (50% инфицирующих доз для тканевой культуры).
- ii) Смеси сыворотки/вируса инкубируют в течение 60 минут при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и при 95% влажности, после чего в каждую лунку вносят по 0,1 мл суспензии клеток Vero (по 200 000 клеток/мл).
- iii) Для каждого исследуемого образца выполняют обратное титрование исходного вируса, используя по 4 лунки на 10-кратное разведение, по 25 мкл/лунка. Планшеты инкубируют в течение 4-5 дней при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и при 95% влажности, до тех пор, пока обратное титрование не покажет, что исходный вирус содержит 30-300 TCID<sub>50</sub>.
- iv) После 4-5-дневной инкубации регистрируют результаты теста, используя инвертированный микроскоп. Присутствие ЦПЭ в лунках, содержащих образец сыворотки, показывает, что исследуемая сыворотка не содержит специфических нейтрализующих антител к используемому в анализе вирусу, в котором невозможна нейтрализация вируса, поэтому происходит лизис клеток с последующей деструкцией клеточного слоя.



И наоборот, отсутствие ЦПЭ в лунках с образцом сыворотки показывает, что тестируемая сыворотка содержит специфические нейтрализующие антитела к используемому в анализе вирусу, в котором происходит нейтрализация вируса и поэтому сохраняется интактный клеточный слой.

v) Альтернативно, планшеты затем фиксируют и окрашивают в растворе, содержащем 0,15% (отношение массы к объему) красителя кристаллвиолета в 2% (отношение объемов) глютаральдегиде и ополаскивают, либо фиксируют 70% этанолом и окрашивают 1% раствором основного фуксина.

vi) 50% конечную точку титрования сыворотки рассчитывают методом Спирмана-Карбера и выражают отрицательным  $\log_{10}$ .

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ**

### **1. Вводная информация**

#### **1.1. Обоснование и предполагаемое использование препарата**

Для контроля ВАЧЛ в Африке и за ее пределами использовали поливалентные или одновалентные живые ослабленные вакцины против АЧЛ, полученные в результате отбора генетически стабильных макробляшек в клеточной культуре Vero (Erasmus, 1976; Sanchez-Vizcaino, 2004). На рынке имеются коммерческие вакцины.

В начале 1990 г. производили серийную инактивированную одновалентную (серотип 4) вакцину против АЧЛ, которую получали в результате очистки вируса и инактивации вируса формалином (House *et al.*, 1992), но в настоящее время эта вакцина отсутствует. Проводилось экспериментальное использование в различных комбинациях субъединичных вакцин ВАЧЛ на основе белков VP2 и VP5 внешнего капсида вируса с серотипом 4 и белка VP7 внутреннего капсида, полученных при использовании одинарного и двойного рекомбинантных экспрессирующих бакуловирусных векторов для иммунизации лошадей (Martinez *et al.*, 1996). Также выполнена оценка защитной эффективности белка VP2 в субъединичной вакцине (Scanlen *et al.*, 2002). Однако серийное производство этих вакцин отсутствует.

### **2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам**

В настоящее время на рынке имеются только живые, ослабленные вакцины против АЧЛ (поливалентные и одновалентные). Руководство по производству ветеринарных вакцин представлено в главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Рекомендации, представленные в данном разделе и в главе 1.1.8, имеют общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

### **3. Живая ослабленная вакцина от африканской чумы лошадей**

#### **3.1. Характеристики посевного вируса**

##### **3.1.1. Биологические характеристики**

Посевной вирус готовят посредством отбора в клеточной культуре Vero крупных, генетически стабильных бляшек, полученных при низких уровнях пассирования ВАЧЛ. После этого мутантные бляшки дополнительно размножают, трижды пересевая на клетках Vero. Полученный в больших количествах антиген лиофилизируют и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  в качестве исходного посевного антигена.

##### **3.1.2. Критерии качества**

Необходимо показать, используя надлежащие методы, что посевной вирус не содержит контаминирующих вирусов, бактерий и микоплазмы. Подтверждается подлинность серотипа посевного вируса.

## **3.2. Способ изготовления**

### **3.2.1. Методика**

В начале серийного производства из исходного посевного антигена в клеточных культурах ВНК-21 или Vero получают рабочие антигены. Рабочие антигены, которые должны содержать не менее  $1 \times 10^6$  бляшкообразующей единицы (БОЕ) инфекционного вируса в миллилитре (БОЕ/мл), тестируют на стерильность, чистоту и подлинность.

### **3.2.2. Требования к субстратам и средам**

Помещенные в роллер-флаконы культуры клеток Vero или ВНК-21 выращивают в ростовой среде, используя гамма-облученную бычью сыворотку. После получения слитых культур среду сливают с клеток, и клетки засеивают рабочими антигенами. Через 1 час к культурам добавляют стабилизирующую среду. Инкубацию при  $37^\circ$  продолжают в течение 2-3 суток. При приближении к ЦПЭ обирают и клетки, и надосадочную жидкость. Продукты с одинаковым серотипом объединяют и хранят при  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.2.3. Внутрипроизводственный контроль**

Полученные клетки объединяют с учетом серотипа и тестируют на инфекционность, выполняя титрования бляшек на клеточных культурах Vero. Минимальный приемлемый титр составляет  $1 \times 10^6$  БОЕ/мл.

В заключение, формируют две поливалентные вакцины, смешивая равные объемы вируса с серотипами 1, 3, 4 и 2, 6, 7, 8 соответственно. Можно также приготовить одновалентную вакцину. После добавления подходящего стабилизатора вакцины разливают в стеклянные флаконы вместимостью 1,0 мл и лиофилизируют.

### **3.2.4. Испытания партии конечного продукта**

#### **i) Стерильность**

После лиофилизации отбирают безвыборочно пять флаконов вакцины и тестируют на стерильность, используя методы, получившие международное признание. Тест на стерильность и отсутствие контаминации биологическими материалами, предназначенными для использования в ветеринарии, описан в главе 1.1.9.

#### **ii) Безопасность**

Для демонстрации безвредности вакцины восстановленной вакциной инокулируют мышью (0,25 мл внутрибрюшинно), морских свинок (1,0 мл внутрибрюшинно) и лошадь (5,0 мл подкожно). Всех животных на протяжении 14 дней ежедневно осматривают. У лошади в течение 14 дней два раза в сутки измеряют ректальную температуру, которая ни при каких обстоятельствах не должна превышать  $39^\circ\text{C}$ .

#### **iii) Активность партии**

Активность в основном определяется концентрацией вируса в вакцине.

Для каждого серотипа минимальная иммунизирующая доза составляет приблизительно  $1 \times 10^3$  БОЕ/доза. Титр инфекционности конечного продукта, который анализируют методом титрования бляшек в клеточной культуре Vero, должен составлять не менее  $1 \times 10^5$  БОЕ/доза. Лошадь, использованную для проверки безопасности, используют также для определения иммуногенности вакцины.

Образцы сыворотки получают в день вакцинации и затем через 21 день и тестируют на присутствие нейтрализующих антител к каждому серотипу методом подавления бляшкообразования, при использовании двукратных разведений сыворотки и приблизительно 100 БОЕ вируса. У лошади должен развиваться титр нейтрализующих антител не ниже 20 в отношении не менее 3 из 4 серотипов, которые входят в состав четырехвалентной вакцины.

### **3.3. Требования к регистрации**

Специальные рекомендации для вакцины против АЧЛ отсутствуют. Однако в ЕС существует руководство с требованиями к вирусу блутанга, применяемое в исключительных обстоятельствах, которое, вероятно, может относиться и к вирусу АЧЛ. Это руководство включает минимальные требования к срокам регистрации вакцин в исключительных обстоятельствах с целью производства вакцины для неотложного применения против вируса блутанга (Постановление ЕС №726/2004, в особенности, статьи 38, 39 и 43, и статья 26 Указания 2001/82/ЕС), включая мероприятия, содействующие быстрому включению новых или других серотипов вируса.

## **4. Вакцины, основанные на использовании биотехнологических методов**

### **4.1. Имеющиеся вакцины и их преимущества**

Такие вакцины отсутствуют на рынке. Описаны экспериментальные субъединичные вакцины (раздел С.1.1 *Обоснование и предполагаемое использование препарата*).

### **4.2. Особые требования к биотехнологическими вакцинам, при наличии**

Отсутствуют.

## **ЛИТЕРАТУРА**

AGÜERO M., GÓMEZ-TEJEDOR C., ANGELES CUBILLO M., RUBIO C., ROMERO E. & JIMÉNEZ-CLAVERO A. (2008). Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 325–328.

ARADAIB I.E. (2009). PCR detection of African horse sickness virus serogroup based on genome segment three sequence analysis. *J. Virol. Methods*, **159**, 1–5.

BACHANEK-BANKOWSKA K., MAAN S., CASTILLO-OLIVARES J., MANNING N.M., MAAN N.S., POTGIETER A.C., DI NARDO A., SUTTON G., BATTEN C. & MERTENS P.P. (2014). Real-time RT-PCR assays for detection and typing of African horse sickness virus. *PLoS One*, **9** (4), e93758.

BAYLIS M., MELLOR P.S. & MEISWINKEL R. (1999). Horse sickness and ENSO in South Africa. *Nature*, **397**, 574.

BREMER C.W., DUNGU-KIMBENGA B. & VILJOEN G.J. (1998). Detection of African horsesickness virus in Zebra by RT-PCR and the development of different methods for confirming AHSV specificity of RT-PCR products. Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, 23–26 March 1998. R & W Publications (Newmarket) Ltd, Newmarket, UK.

COETZER J.A.W. & GUTHRIE.A.J. (2005). African horsesickness. *In: Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition. Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, 1231–1246.

ERASMUS B.J. (1976). A new approach to polyvalent immunisation against African horse sickness. *In: Proceedings of the Fourth International Conference on Equine Infectious Diseases*, Lyon, France, September 1976. Princeton, N.J. Veterinary Publications, USA, 401–403.

EUROPEAN COMMISSION (2002). Commission decision of 21 February 2002 amending Annex D to Council Directive 90/426/EEC with regard to the diagnostic tests for African horse sickness. *Off. J. European Communities*, **L53**, 37–42.

FERNÁNDEZ-PINERO J., FERNÁNDEZ-PACHECO P., RODRÍGUEZ B., SOTELO E., ROBLES A., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2009). Rapid and sensitive detection of African horse sickness virus by real-time PCR. *Res. Vet. Sci.*, **86**, 353–358.

GRUBMAN M. & LEWIS S. (1992). Identification and characterisation of the structural and non-structural proteins of African horse sickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology*, **186**, 444–451.

GUTHRIE A.J., MACLACHLAN N.J., JOONE C., LOURENS C.W., WEYER C.T., QUAN M., MONYAI M.S. & GARDNER I.A. (2013). Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horsesickness virus. *J. Virol. Methods*, **189**, 30–35.

HAMBLIN C., GRAHAM S.D., ANDERSON E.C. & CROWTHER J.R. (1990) A competitive ELISA for the detection of group-specific antibodies to African horse sickness virus. *Epidemiol. Infect.*, **104**, 303–312.

HOUSE C., MIKICIUK P.E. & BERNINGER M.L. (1990). Laboratory diagnosis of African horse sickness: comparison of serological techniques and evaluation of storage methods of samples for virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**, 44–50.

HOUSE J., LOMBARD M., HOUSE C., DUBOURGET P. & MEBUS C. (1992). Efficacy of an inactivated vaccine for African horse sickness serotype 4. *In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium*, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 891–895.

KOEKEMOER M.J.P. (2008). Serotype-specific detection of African horsesickness virus by real-time PCR and the influence of genetic variations. *J. Virol. Methods*, **154**, 104–110.

LAVIADA M.D., ARIAS M. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (1993). Characterization of African horse sickness virus serotype 4-induced polypeptides in Vero cells and their reactivity in Western immunoblotting. *J. Gen. Virol.*, **74**, 81–87.

LAVIADA M.D., ROY P. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M (1992). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. *In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium*. Walton T.E. & Osburn B.I., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646–650.

LAVIADA M.D., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., ROY P. & SOBRINO F. (1997). Detection of African horsesickness virus by the polymerase chain reaction. *Invest. Agr. SA.*, **12**, 97–102.

MAAN N.S., MAAN S., NOMIKOU K., BELAGANAHALLI M.N., BACHANEK-BANKOWSKA K. & MERTENS P.P.C. (2011). Serotype-specific primers and gel-based RT-

PCR assays for „typing“ African horse sickness virus: identification of strains from Africa. *PLoS One*, **6** (10), e25686.

MAREE S. & PAWESKA J.T. (2005). Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. *J. Virol. Methods*, **125**, 55–65.

MARTINEZ J., DIAZ-LAVIADA M., ROY P., SANCHEZ C., VELA C., SANCHEZ-VIZCAINO J.M. & CASAL I. (1996). Full protection against AHSV in horses induced by baculovirus-derived AHS virus serotype 4 VP2, VP5 and VP7. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1211–1221.

MARTINEZ-TORRECUADRADA J., LANGEVELD J., MELOEN R. & CASAL I. (2001). Definition of neutralizing sites on African horse sickness virus serotype 4 VP2 at the level of peptides. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2415–2424.

OIE (World Organisation for Animal Health) (2010). African horse sickness. *In: Atlas of Transboundary Animal Diseases*, Fernandez P.J. & White W.R., eds. OIE, Paris, France, 12–18.

QUAN M., LOURENS C.W., MACLACHLAN N.J., GARDNER I.A. & GUTHRIE A.J. (2010). Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods*, **167**, 45–52.

RODRIGUEZ-SANCHEZ B., FERNANDEZ-PINERO J., SAILLEAU C., ZIENTARA S., BELAK S., ARIAS M. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2008). Novel gel-based and real-time PCR assays for the improved detection of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods*, **151**, 87–94.

ROY P., HIRASAWA T., FERNANDEZ M., BLINOV V.M. & SANCHEZ-VIZCAINO RODRIGUEZ J.M. (1991). The complete sequence of the group-specific relationship to bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1237–1241.

RUBIO C., CUBILLO M.A., HOOGHUIS H., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., DIAZ-LAVIADA M., PLATEAU E., ZIENTARA S., CRUCIERE C. & HAMBLIN C. (1998). Validation of ELISA for the detection of African horse sickness virus antigens and antibodies. *Arch. Virol. (Suppl.)*, **14**, 311–315.

SAILLEAU C., HAMBLIN C., PAWESKA J. & ZIENTARA S. (2000). Identification and differentiation of nine African horse sickness virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *J. Gen. Virol.*, **81**, 831–837.

SAKAMOTO K., PUNYAHOTRA R., MIZUKOSHI N., UEDA S., IMAGAWA H., SUGIURA T., KAMADA M. & FUKUSHO A. (1994). Rapid detection of African horsesickness virus by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using the amplicon for segment 3 (VP3 gene). *Arch. Virol.*, **36** (1–2), 87–97.

SANCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2004). Control and eradication of African horse sickness with vaccine. *In: Control of Infectious Diseases by Vaccination*, Schudel A. & Lombard M., eds. Developments in Biologicals, **119**, 255–258. S. Karger AG, Basel, Switzerland.

SCANLEN M., PAWESKA J., VERSCHOOR J. & DIJK A. (2002). The protective efficacy of a recombinant VP2-based African horsesickness subunit vaccine candidate is determined by adjuvant. *Vaccine*, **20**, 1079–1088.

STONE-MARSCHAT M., CARVILLE A., SKOWRONEK A. & LAEGREID W.W. (1994). Detection of African horse sickness virus by reverse transcription PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 697–700.

VAN NIEKERT M., VAN STADEN V., VAN DIJK A.A. & HUISMANS H. (2001). Variation of African horsesickness virus nonstructural protein NS3 in southern Africa. *J. Gen. Virol.*, **82**, 149–158.

VENTER M., NAPIER G. & HUISMANS H. (2000). Cloning, sequencing and expression of the gene that encodes the major neutralisation-specific antigen of Africa horsesickness virus serotype 9. *J. Virol. Methods*, **86**, 41–53.

VERWOERD D.W., HUISMANS H., ERASMUS B.J. (1979). Orbiviruses. *In: Comprehensive Virology*, Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R., eds. Plenum Press, London, UK, Vol. **14**, 285–345.  
WADE-EVANS A., WOOLHOUSE T., O'HARA R. & HAMBLIN C. (1993). The use of African horse sickness virus VP7 antigen, synthesised in bacteria, and anti-VP7 monoclonal antibodies in a competitive ELISA. *J. Virol. Methods*, **45**, 179–188.

WEYER C.T., JOONE C., LOURENS C.W., MONYAI M.S., KOEKEMOER O., GREWAR J.D., VAN SCHALKWYK A., MAJIWA P.O., MACLACHLAN N.J. & GUTHRIE A.J. (2015). Development of three triplex real-time reverse transcription PCR assays for the qualitative molecular typing of the nine serotypes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods*, **223**, 69–74.

WILLIAMS C.F., INOUE T., LUCUS A.M., ZANOTTO P.M. & ROY Y.P. (1998). The complete sequence of four major structural proteins of African horse sickness virus serotype 6: evolutionary relationship within and between the orbivirus. *Virus Res.*, **53**, 53–73.

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. & CRUCIERE C. (1994). Diagnosis of the African horse sickness virus serotype 4 by a one-tube, one manipulation RT-PCR reaction from infected organs. *J. Virol. Methods*, **46**, 179–188.

\*

\* \*

ВНИМАНИЕ: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по диагностике африканской чумы лошадей (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных* или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики африканской чумы лошадей, просим Вас обращаться в Справочные лаборатории МЭБ.