

ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ АРТЕРИИТА ЛОШАДЕЙ

РЕЗЮМЕ

Инфекция вирусом артериит лошадей (ИВАЛ) – контагиозное вирусное заболевание представителей семейства лошадиных, вызываемое вирусом артериита лошадей (ВАЛ), РНК-содержащим вирусом, который принадлежит к роду Arterivirus, семейству Arteriviridae. Вирус артериита лошадей обнаружен в популяциях лошадей во многих странах мира. Хотя в прошлом упоминании об этом заболевании встречались нечасто, в настоящее время подтвержденные вспышки ИВАЛ отмечаются с возрастающей частотой.

Описание болезни: В большинстве случаев ИВАЛ, вызванные естественным заражением, имеют субклиническое течение. Если клинические признаки присутствуют, то их спектр и тяжесть могут варьировать. Принципиальные характеристики включают лихорадку, депрессию, анорексию, застойный отек, в особенности, конечностей, мошонки и препуция у жеребцов, конъюнктивит, уртикарноподобную кожную реакцию, аборт и в редких случаях, молниеносную пневмонию, энтерит или пневмоэнтерит у молодых жеребят. За исключением летальности молодых жеребят, частота случаев с летальным исходом при вспышках ИВАЛ очень низка. Заболевшие лошади почти всегда полностью выздоравливают. Длительное состояние носительства возбудителя возможно у некоторой части инфицированных жеребцов, но не среди кобыл, мерин или неполовозрелых жеребят.

Идентификация возбудителя: ИВАЛ невозможно отличить по клиническим проявлениям от ряда других респираторных и системных заболеваний лошадей. Диагностировать ИВАЛ возможно только лабораторными методами; диагностика основана на выделении вируса, детекции нуклеиновой кислоты или вирусного антигена или демонстрации специфичного гуморального ответа. В целях детекции и идентификации нуклеиновой кислоты ИВАЛ при подозрении на заболевание могут быть предприняты попытки применения разнообразных анализов методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Подлинность изолятов вируса артериита лошадей (ВАЛ) следует подтвердить методом ОТ-ПЦР, реакцией нейтрализации вируса или иммуноцитохимическими методами, а именно, методом непрямой иммунофлуоресценции или иммунопероксидазным методом с авидин-биотиновым усилением.

В тех случаях, когда летальность животных ассоциирована с предполагаемой вспышкой ИВАЛ, необходимо исследовать самые разнообразные ткани, для того чтобы получить доказательства панваскулита, особенно выраженного в мелких артериях всех органов тела. Наблюдаемые у взрослых животных характерные поражения сосудов не являются существенной особенностью связанных с ИВАЛ абортов, диагностика которых основана на выделении вируса, детекции нуклеиновой кислоты методом ОТ-ПЦР или демонстрации антигенов ВАЛ при иммуногистохимическом исследовании плаценты и разнообразных тканей плода.

Серологические исследования: Для детекции антител к ВАЛ применяются разнообразные серологические реакции, включая реакцию нейтрализации вируса (НВ), связывания комплемента (РСК), непрямой метод флуоресцирующих антител,

иммунодиффузию в агаровом геле, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и иммуноанализ с использованием флуоресцентных микросфер. В настоящее время наиболее широко используемыми методами являются реакция комплемент-зависимой нейтрализации вируса и твердофазный ИФА. Реакция НВ – очень чувствительный и высокоспецифичный метод, хорошо зарекомендовавший себя при использовании для диагностики острых инфекций и в исследованиях серопревалентности. Разработано несколько вариантов твердофазного ИФА. Хотя ни один из них не прошел настолько широкую валидацию, как реакция НВ, некоторые варианты демонстрируют сопоставимую специфичность и близкую или даже равную чувствительность. РСК уступает по чувствительности реакции НВ и твердофазному ИФА, но может применяться для диагностики недавно инфицированных животных.

Требования к вакцинам: В настоящее время на рынке присутствуют две коммерческие приготовленные на культуре ткани (культуральные) вакцины против ИВАЛ. Одна из них представляет собой ослабленную живую вирусную вакцину (ОЖВК), приготовленную из вируса, ослабленного для лошадей, в результате многократных последовательных переносов в первичных культурах клеток лошади и клеток почки кролика и линии клеток кожи лошади. Подтверждена безопасность и защитные свойства этой вакцины для жеребцов и нежеребых кобыл. Эту вакцину не рекомендуется вводить жеребятам моложе 6 недель и жеребым кобылам в последние 2 месяца беременности. Данные о реверсии вакцинного вируса с восстановлением вирулентности или о рекомбинации с природными штаммами ВАЛ после применения в полевых условиях отсутствуют. Вторая вакцина представляет собой инактивированный препарат с добавлением адьюванта, который получают из вируса, выращенного в культуре клеток лошади, и который можно использовать для вакцинации племенных и неплеменных лошадей. В настоящее время эту вакцину не рекомендуется использовать для вакцинации жеребых кобыл из-за отсутствия соответствующих данных по безопасности.

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Описание и этиология заболевания

Инфекция вирусом артериит лошадей (ИВАЛ) – контагиозное вирусное заболевание представителей семейства лошадиных, возбудителем которого является вирус артериита лошадей (ВАЛ), содержащий одноцепочечную РНК с положительной полярностью, типичный представитель рода *Arterivirus*, принадлежащего к семейству *Arteriviridae*, и порядку *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). До настоящего времени идентифицирован только один важный серотип вируса. В отношении болезни лошадей, близко напоминающей ИВАЛ, в прошлом использовали следующие описательные термины: эпизоотический лимфангит, розовый глаз, тифоидная лихорадка, и инфлюэнца лошадей. Спектр естественных организмов-хозяев ВАЛ ограничен животными семейства лошадиных, хотя имеются ограниченные данные, указывающие на то, что в этот список можно также включить животных семейства верблюдовых, а именно, альпак и лам (Weber *et al.*, 2006). Вирус не опасен для здоровья человека (Timoney & McCollum, 1993).

Хотя большинство случаев острой инфекции вирусом артериита лошадей имеют субклиническое течение, некоторые штаммы вируса могут вызывать заболевания различной степени тяжести (Timoney & McCollum, 1993). В типичных случаях ИВАЛ могут наблюдаться один из следующих клинических признаков или же эти признаки в

любом сочетании: лихорадка, угнетенное состояние, анорексия, лейкопения, застойный отек, в особенности, конечности, мошонки и препуция у жеребцов, конъюнктивит, выделения из глаз, надглазничный или окологлазничный отек, ринит, выделения из носа, местная или генерализованная уртикароподобная кожная реакция, временное снижение фертильности у жеребцов с острым течением заболевания, аборт, мертворождения и, в редких случаях, молниеносная пневмония, энтерит или пневмоэнтерит у молодых жеребят.

Несмотря на тяжесть клинических признаков, заболевшие лошади почти всегда полностью выздоравливают. Частота случаев с летальным исходом при вспышках ИВАЛ очень низка; летальные исходы обычно наблюдаются только в случае заражения очень молодых жеребят, вероятно с врожденной вирусной инфекцией (Timoney & McCollum, 1993; Vaala *et al.*, 1992), взрослые и здоровые в остальных отношениях лошади гибнут очень редко.

Некоторый процент остро инфицированных жеребцов позднее становятся долгосрочными носителями вируса в половых путях и постоянными распространителями вируса со спермой (Timoney & McCollum, 1993). Состояние носительства, признанное андрогено-зависимым, обнаружено у жеребцов, но не у кобыл, мерин или неполовозрелых жеребят (Timoney & McCollum, 1993). Хотя временное снижение концентрации циркулирующего тестостерона посредством использования антагонистов рецептора гонадотропин-рилизинг гормона ГРГ или посредством иммунизации рецептором ГРГ приводит к ускоренному освобождению некоторых жеребцов от состояния носительства, эффективность какой-либо из перечисленных стратегий лечения до настоящего времени не установлена. Высказано опасение, что такой терапевтический подход может быть использован для преднамеренного скрывания состояния носительства.

Макроскопические и микроскопические поражения, описанные погибших животных, инфицированных ИВАЛ, отражают вызываемые вирусом обширные поражения сосудов (Del Piero, 2000). ВАЛ вызывает широко распространенный васкулит, главным образом, мелких артериол и венул. Васкулит приводит к отекам, застойным явлениям и кровоизлияниям, в особенности, в подкожных тканях конечностей и живота, и к скоплению избыточной жидкости в брюшной полости, плевре и перикарде (Jones *et al.*, 1957). У молодых жеребят, погибших после заражения ВАЛ, описаны отек легких, эмфизема легких и интерстициальная пневмония, энтерит, инфаркт селезенки (Del Piero, 2000). В случае абортов макроскопические поражения обычно отсутствуют, а микроскопические изменения, если таковые присутствуют, то чаще всего наблюдаются в плаценте, селезенке и легких плода.

Применительно к эпидемиологии ИВАЛ большое значение имеют следующие факторы: фенотипическая изменчивость вирусных штаммов, механизм передачи вируса в острой и хронической фазах инфекции; состояние носительства у жеребцов, природа и продолжительность приобретенного иммунитета и меняющиеся тенденции в коневодстве. ВАЛ присутствует в популяциях лошадей во многих странах мира (Timoney & McCollum, 1993). В последние годы количество случаев ИВАЛ увеличивается в связи с более частыми перемещениями лошадей и транспортировкой и последующим использованием спермы (Balasuriya *et al.*, 1998). Передача ВАЛ осуществляется через органы дыхания, половым путем и внутриуробно. В острой фазе инфекции распространение вируса происходит, в первую очередь, через органы

дыхания. Возможна также передача вируса половым путем от жеребца или кобылы острой инфекцией, и также от жеребка-носителя.

Действующие программы по борьбе с ИВАЛ направлены на предотвращение распространения ВАЛ в племенных популяциях для минимизации риска абортов во время вспышек заболевания, гибели молодых жеребят и состояния носительства у жеребят и жеребцов (Timoney & McCollum, 1993). Такие программы основаны на соблюдении надлежащей практики содержания животных в сочетании с программой целевой вакцинации от данного заболевания племенных жеребцов и неполовозрелых жеребят.

2. Дифференциальная диагностика

ИВАЛ невозможно различить клинически от ряда других респираторных и системных заболеваний лошадей, наиболее распространенными из которых являются грипп лошадей, инфекции герпесвирусами лошадей 1 и 4, инфекция вирусами ринита лошадей А и В, инфекция, вызванные аденовирусом и лошадей и стрептококковая инфекция, особое место среди которых занимает геморрагическая пурпура. Клинические признаки заболевания сходны также с признаками инфекционной анемии лошадей, инфекции вирусом энцефалоза лошадей, африканской чумы лошадей, некоторых случаев инфекции вирусом Хендра, инфекции вирусом Гета и токсикоза, вызванного икотником серым (*Berteroa incana*) (Timoney & McCollum, 1993).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики инфекции, вызванной вирусом артериит лошадей, и их назначение

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Участие в деятельности, направленной на ликвидацию возбудителя	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Выделение вируса	-	+++	-	+++	-	-
ПЦР	-	+++	-	+++	-	-
Детекция иммунного ответа						
ИДАГ	-	-	-	-	-	-
РСК	-	-	-	+++	-	-
Твердофазный ИФА	+	++	+	++	+++	+
НВ	+	+++	+	+++	+++	+++

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.

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

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.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; ИДАГ = иммунодиффузия в агаровом геле; РСК = реакция связывания комплемента; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; НВ = нейтрализация вируса.

Для обнаружения и идентификации ВАЛ в соответствующих клинических образцах и образцах ткани могут быть использованы методы выделения вируса в культуре клеток и детекции вирусной нуклеиновой кислоты с помощью ряда методов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Оба диагностических подхода пригодны для подтверждения клинических случаев ИВАЛ и для заключения об отсутствии инфекции ВАЛ у отдельных животных. В последнее время метод посева и выделение вируса и анализы ПЦР-ОТ используются в надзорных исследованиях и при принятии решений о перемещении животных. Детекция антигена посредством использования разнообразных методов мечения антителами также имеет диагностическое применение при исследовании тканей животных при подозрении на аборт, вызванный ИВАЛ, смерти молодых жеребят или старых лошадей.

Может быть предпринята попытка выделения ВАЛ в немногочисленных линиях клеток, среди которых оптимальной признана линия клеток почки кролика RK-13 (ATCC CCL37 или RK13-KY², особенно применительно к тестированию спермы жеребцов. В нескольких подробных сравнительных исследованиях показано, что применительно к выделению вируса ОТ-ПЦР позволяет с равной чувствительностью обнаруживать ВАЛ в клиническом и патологическом материале. Хотя во многих случаях вирус выделяют при первом же пассаже в культуре клеток, выделение вируса не является быстрым диагностическим методом в отличие от некоторых анализов ОТ-ПЦР, которые могут быть выполнены за один день.

Для детекции ВАЛ разработаны разнообразные варианты анализа ОТ-ПЦР (одностадийный, гнездовой, в реальном времени). К сожалению, лишь для очень немногих из них выполнены надлежащая валидация и сравнение с методом выделения вируса с точки зрения чувствительности и специфичности. Обращаем особое внимание на то, что выбор наборов реактивов для экстракции и амплификации нуклеиновой кислот при анализе ОТ-ПЦР может оказывать большое влияние на диагностическую чувствительность в целом и устойчивость анализа (Miszczak *et al.*, 2011).

Для иммуногистохимического тестирования на присутствие антигена ВАЛ в замороженных или фиксированных срезах ткани наиболее оптимальным является использование моноспецифичной поликлональной сыворотки против вируса либо моноклонального антитела (MAb) к высококонсервативному белку вирусного нуклеокапсида (N).

Оценка серологических реакций, применяемых для детекции антител к ВАЛ, показала, что реакция комплемент-зависимой нейтрализации вируса (НВ) обеспечивает наиболее

² Клетки можно приобрести в Справочной лаборатории МЭБ, в которой проводится изучение инфекции вирусом артериита лошадей, в Соединенных Штатах Америки (подробная информация о контактах представлена на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

достоверные результаты при диагностике острой инфекции ВАЛ и в эпидемиологических надзорных исследованиях, основанных на серологическом скрининге. Несколько из многочисленных разработанных методов твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) обладают чувствительностью и специфичностью, сопоставимой, но не идентичной соответствующим параметрам реакции НВ. Преимущество твердофазного ИФА, применяемого для детекции ВАЛ, заключается в возможности получения результата в течение одного дня, тогда как продолжительность реакции НВ составляет 72 часа. Ни один из существующих методов не позволяет достоверно дифференцировать титры антител, образовавшихся в результате естественного заражения, от антител, образовавшихся после вакцинации.

1. Идентификация возбудителя

1.1. В культуре *in vitro*

В случае предполагаемой вспышки ИВАЛ или при попытке подтвердить случай субклинической инфекции ВАЛ, следует попытаться выделить вирус из носоглоточных или глубоких носовых мазков, конъюнктивальных мазков, образцов несвернувшейся крови и спермы жеребцов, являющихся предполагаемыми носителями вируса (Timoney & McCollum, 1993). Для того чтобы оптимизировать шансы выделения вируса во время вспышки следует получить релевантные образцы как можно раньше после возникновения лихорадки у заболевших лошадей. Если предпринимается попытка выделить вируса из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), образцы крови следует получать в пробирки с цитратным антикоагулянтом в этилендиаминтетраацетате (ЭДТА). Поскольку гепарин может подавлять рост ВАЛ в клетках почки кролика (линии клеток RK-13), применение гепарина в качестве антикоагулянта недопустимо, так как он может препятствовать выделению вируса из цельной крови. В тех случаях, когда ИВАЛ является предполагаемой причиной летальности молодых жеребят или старых животных, могут быть предприняты попытки выделения вируса из разнообразных тканей, в особенности, лимфатических желез, ассоциированных с пищеварительным трактом и связанных с ним органов, и также из легких, печени и селезенки (McCollum *et al.*, 1971). При вспышках связанных с ИВАЛ абортос и/или мертворожденных жеребят продуктивными источниками вируса могут быть ткани плаценты, разнообразные лимфоретикулярные и другие ткани плода (в особенности, легкого (Timoney & McCollum, 1993).

Предназначенные для выделения вируса тампоны следует погрузить в подходящую транспортную среду для вирусов и транспортировать в лабораторию в идеале в течение 24 часов вместе с другими жидкостями или тканями, полученными для выделения вируса и/или анализа ОТ-ПЦР, в охлажденном или замороженном виде, в изотермическом контейнере. Если тампоны предназначены для прямого исследования методом ОТ-ПЦР, тампон не должен быть изготовлен из древесины, которая может содержать вещества, например, консерванты, которые могут исказить результаты ПЦР. Образцы свернувшейся крови следует транспортировать в охлажденном, но не замороженном виде. По возможности образцы следует направлять в лабораторию, признанную компетентной в тестировании по поводу данной инфекции.

Обработка носоглоточных тампонов, помещенных в транспортную среду, заключается в переносе их в цилиндр шприца вместимостью 10 мл с установленным плунжером, после чего всю жидкость, которую можно извлечь из шприца переносят в стерильную пробирку. Аликвоту жидкости пропускают через предварительный фильтр и затем

фильтруют через шприц с мембранным фильтром с размером пор 0,45 мкм, и асептически собирают для последующей инокуляции культуры клеток.

Для того чтобы собрать лейкоцитарную пленку с несвернувшейся крови образец центрифугируют в течение 15 минут при 600 g, и после осторожного удаления плазмы снимают лейкоцитарную пленку. После этого лейкоцитарную пленку наслаивают на раствор для разделения МКПК, Ficoll 1,077, и центрифугируют в течение 20 минут при 400 g. Поверхность раздела МКПК (без большинства гранулоцитов) дважды промывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) (в течение 10 минут при 300 g) и ресуспендируют в 1 мл минимальной питательной среды Игла (MEM), содержащей 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS). К монослоям клеток RK-13, находящимся в культуральных колбах с поверхностью культивирования 25 см² или планшетах с многослойными стенками с добавленной в них поддерживающей средой, добавляют 0,5 мл суспензии промытых клеток.

При выделении вируса из клинических образцов или посмертных тканей рекомендуется использовать культуру клеток почки кролика, лошади или обезьяны (Timoney *et al.*, 2004; Timoney & McCollum, 1993), хотя эти клетки не всегда позволяют успешно выделить вирус в случаях естественного заражения ВАЛ-инфекцией (Timoney & McCollum, 1993). Могут быть использованы выбранные линии клеток, например, RK-13 (ATCC CCL-37), LLC-MK₂ (ATCC CCL-7), и первичная культура клеток почки лошади или кролика, при этом наиболее предпочтительны клетки RK-13 (Timoney *et al.*, 2004). Многолетний опыт показывает, что если используемая система культивирования клеток неоптимальна, то прямой посев ВАЛ из спермы может оказаться более сложным, чем выделение вируса из других клинических образцов или других инфицированных тканей. Показано, что на прямой посев ВАЛ из спермы в клетках RK-13 влияют несколько факторов. Более высокие показатели выделения достигаются при использовании 3-5 дневных слитных монослоев, большого количества посевного материал по отношению к площади поверхности клеток в колбах для инокуляции или планшетах с многослойными стенками и, самое важное, при включении карбоксиметилцеллюлозы (со средней вязкостью 400-800 сантипуаз) в покровную питательную среду. Следует отметить, что большинство клеток RK-13, включая ATCC CCL-37, контаминированы вирусом диареи крупного рогатого скота, присутствие которого повышает чувствительность данной клеточной системы к первичному посеву ВАЛ, в особенности из спермы. В случае образцов с низкой инфекционностью вируса показатели выделения можно повысить, используя многократно пассированные клетки RK-13³ (Timoney *et al.*, 2004).

Инокулированные культуры ежедневно осматривают для выявления цитопатического эффекта (ЦПЭ) вируса, который обычно становится очевидным через 2-6 дней. В отсутствии видимого ЦПЭ надосадочной жидкостью культуры следует через 4-7 дней субинокулировать монослои слитых клеток. Хотя в подавляющем большинстве случаев выделение ВАЛ достигается при первом пассаже на культуре клеток, в незначительном меньшинстве случаев присутствие вируса становится очевидным при втором или последующих пассажах *in vitro* (Timoney & McCollum, 1993). Для подтверждения

³ Такую линию клеток (RK-13-KY) можно приобрести в Справочной лаборатории МЭБ, в которой проводится изучение инфекции вирусом артериита лошадей, в Соединенных Штатах Америки (подробная информация о контактах представлена на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

подлинности изолятов ВАЛ может быть использованы стандартный анализ ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени (Balasuriya *et al.*, 1998), однонаправленная реакция нейтрализации вируса или иммуноцитохимический метод (Little *et al.*, 1995), непрямая иммунофлуоресценция (Crawford & Henson, 1973) или иммунопероксидазный метод с авидин-биотиновым усилением (АВС) (Little *et al.*, 1995). Для идентификации ВАЛ в инфицированных культурах клеток применялась поликлональная кроличья антисыворотка. Разработаны моноклональные мышинные антитела (MAb) к белку нуклеокапсида (N) и мажорному гликопротеину оболочки (GP5) ВАЛ и также моноспецифичная кроличья антисыворотка к негликозилированному белку оболочки (M) (Balasuriya *et al.*, 1998), которые позволяют обнаружить разнообразные штаммы вируса в клетках RK-13 уже через 12-24 часов после инфицирования (Balasuriya *et al.*, 1998; Little *et al.*, 1995).

1.2. Посев и выделение вируса из спермы

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что жеребцы, которые в течение длительного или короткого времени являются носителями ВАЛ, постоянно распространяют вирус, содержащийся у них в сперме, но не в секрете органов дыхания или моче; не продемонстрировано также присутствие вируса в лейкоцитарной пленке (моноклеарных клетках периферической крови) таких животных (Timoney *et al.*, 1987; Timoney & McCollum, 1993). Обследование жеребцов следует начинать с анализа крови с использованием реакции нейтрализации вируса или надлежащим образом валидированного твердофазного ИФА или других серологических методик. У серологически позитивных жеребцов с антителами к ВАЛ, например, титром НВ $\geq 1/4$, при отсутствии Свидетельства о вакцинации против ВАЛ, и также жеребцов с подтвержденной серонегативностью на момент первой вакцинации (с титром НВ $< 1/4$), следует предпринять попытку посева и выделения вируса из спермы. Посев вируса показан также в случае приобретенной спермы, если отсутствует информация о серологическом статусе жеребца-донора и, возможно, вакцинационном анамнезе. Рекомендуется выполнить посев вируса из двух образцов, которые могут быть получены в один день, или в последовательные дни, или после интервала в несколько дней или недель. Данные о влиянии частоты получения образцов, или интервала между получением образцов, или времени года на результат посева вируса из образцов каких-либо жеребцов отсутствуют. Для посева ВАЛ предпочтительно использовать порцию всего эякулята, для сбора которого используется искусственное влагалище или презерватив и кобыла-раздражитель или ее модель. При невозможности получения спермы таким способом используют менее предпочтительную альтернативу: образец спермы, полученный в случном сезоне. Следует позаботиться о том, чтобы при очистке наружных половых органов жеребца перед получением образца не использовались антисептики/дезинфектанты. Образцы должны содержать фракцию эякулята с высоким содержанием сперматозоидов, с которой ассоциирован ВАЛ, поскольку во фракции спермы без сперматозоидов вирус отсутствует (Timoney *et al.*, 1987; Timoney & McCollum, 1993). Сразу после получения сперму следует охладить в измельченном льду или аккумуляторах холода с последующей как можно более быстрой транспортировкой в лабораторию. В тех случаях, когда вероятно задержка при представлении образца для исследования, сперму следует заморозить при температуре -20°C или ниже на короткий период времени перед отправкой в лабораторию. Замораживание образца не препятствует выделению ВАЛ из спермы. В ситуациях, когда определить статус жеребца (т.е. потенциальное носительство) методом выделения вируса или анализа ОТ-ПЦР, может быть выполнено экспериментальное спаривание жеребца с двумя серонегативными кобылами, которых проверяют на потенциальную вызванную

вирусом сероконверсию в течение 28 дней после спаривания (Timoney & McCollum, 1993).

У жеребцов, которым вводили антагонист гонадотропин-рилизинг гормона, или иммунизировали ГРГ для модификации репродуктивной активности или поведения, достоверно определить статус носительства невозможно из-за возможного перерыва в выделении ВАЛ, вызванного такой обработкой.

1.2.1. Методика

i) При получении образца в лаборатории следует отметить температуру образца, который может быть замороженным, охлажденным или иметь температуру окружающей среды. Следует проверить каждый образец, чтобы убедиться в том, что он содержит богатую сперматозоидами фракцию эякулята. У некоторых жеребцов могут выделяться большие объемы семенной плазмы перед эякуляцией богатой сперматозоидами и студенистой фракцией спермы. Часто в этой фракции, предварительной фракции содержится очень небольшое количество сперматозоидов, и она может быть ВАЛ-негативной даже у жеребца-носителя ВАЛ (Timoney *et al.*, 1987). Для оптимизации детекции вируса по 50 мкл каждого образца спермы следует перенести на стеклянное предметное стекло, накрыть покровным стеклом и изучить под микроскопом при 100-кратном увеличении, чтобы оценить содержание сперматозоидов. Эякуляты с средним содержанием менее 5 сперматозоидов в 10 изученных полях зрения следует признать имеющими сомнительную диагностическую ценность. Следует отметить, что эпизодически встречаются жеребцы с олигоспермией, которые могут быть ВАЛ-позитивными даже при низком содержании сперматозоидов. С другой стороны, если в образце не обнаружен вирус, в отчет о анализе такого жеребца следует включить замечание о невозможности гарантировать отсутствие ВАЛ из-за низкого содержания сперматозоидов в представленном образце. Дополнительно, образцы эякулята следует изучить визуально и зарегистрировать цвет и потенциальное дисперсное загрязнение. В случае загрязнения образца спермы кровью, присутствие которой может объясняться травмой наружных половых органов жеребца во время получения образца спермы, следует запросить новый образец, потому что тестирование такого образца, полученного у серологически позитивного жеребца может снизить достоверность результата посева из-за наличия антител в сыворотке. В очень редких случаях эякулят может иметь желтоватый оттенок из-за загрязнения мочой. Такие образцы могут быть позитивными по вирусу ринита лошадей А.

ii) Хотя кратковременная обработка спермы ультразвуком (три 15-секундных цикла) перед инокуляцией культуры клеток более не считается необходимым этапом, но способствует эффективному перемешиванию и диспергированию образца.

iii) После удаления культуральной среды 3-5-дневные культуры клеток RK-13, представляющие собой монослой слитых клеток и находящиеся в культуральных колбах с поверхностью культивирования 25 см² или многолуночных планшетах, инокулируют серийными 10-кратными разведениями (от 10⁻¹ до 10⁻³) семенной плазмы в поддерживающей тканевую культуру среде, содержащей 2% фетальной телячьей сыворотки и антибиотики. В каждую колбу с поверхностью культивирования вносят по 1 мл инокулята, инокулируют не менее двух колб с каждым разведением семенной плазмы. При использовании многолуночных планшетов количество инокулята и число лунок, инокулированных каждым разведением образца, следует пропорционально пересчитать. В каждый эксперимент необходимо включать соответствующие

разведения образца спермы, представляющие собой вирус-положительный контроль, или вирусный контроль с известным титром, разведенный культуральной средой.

vi) Колбы закрывают, многоруночные планшеты накрывают крышками и осуществляют инокуляцию культур при осторожном вращении, для распределения инокулята поверх монослоев клеток.

v) Затем инокулированные культуры инкубируют в течение 1 часа при 37°C в аэробном термостате или термостате с влажной атмосферой, содержащей 5% CO₂ в воздухе, в зависимости от используемой посуды: колб или многоруночных планшетов.

iv) Без предварительного удаления инокулята и промывания монослоев клеток на монослой наслаивают среду с антибиотиками, содержащую 0,75% карбоксиметилцеллюлозы.

vii) Колбы или планшеты повторно инкубируют при 37°C и выполняют микроскопическую проверку вирусного ЦПЭ, который обычно становится заметным через 2-6 дней.

viii) При отсутствии видимого ЦПЭ через 5-7 дней надосадочными жидкостями культуры субинокулируют 3-5-дневные культуры клеток RK-13, представляющие собой монослой слитых клеток, нанося надосадочную жидкость поверх культуры клеток. После удаления наслаиваемой сверху среды монослой окрашивают 0,1% раствором кристаллического фиолетового, забуференного формалином.

Подлинность изолятов вируса следует подтвердить результатами стандартной ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени (Balasuriya *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 1997; Balasuriya *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007; Westcott *et al.*, 2003; Mischczak *et al.*, 2011), реакции ИМ, иммунофлуоресценции (Crawford & Henson, 1973) или методом АВС с использованием моноспецифичной антисыворотки к ВАЛ или моноклональных антител к структурным вирусным белкам N или GP5 (Balasuriya *et al.*, 1998; Del Piero, 2000; Little *et al.*, 1995).

При выполнении односторонней реакции нейтрализации серийные 10-кратные разведения изолята вируса проверяют в отношении нейтрализующего МАб или моноспецифичной антисыворотки против прототипного штамма *Vesivirus* вируса артериита лошадей (ATCC VR 796) и также сыворотки, негативной для нейтрализующих вирус антител. В качестве контроля в эксперимент включают соответствующие титры прототипного вируса *Vesivirus* с теми же референтными антителами. Эксперимент проводят в культуральных колбах с поверхностью культивирования 25 см² или многоруночных планшетах. Соответствующие количества известных ВАЛ-позитивных и ВАЛ-негативных препаратов антител инактивируют в течение 30 минут на водяной бане при 56°C и разбавляют в соотношении 1/4 фосфатно-солевым буферным раствором, pH 7,2; затем 0,3 мл разбавленного препарата антител вносят в пять пробирок для каждого исследуемого изолята. Получают серийные 10-кратные разведения (от 10⁻¹ до 10⁻⁵) каждого вирусного изолята в среде Игла MEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, антибиотики и 10% свежеразведенного комплемента морской свинки. Затем в пробирки с ВАЛ-позитивным и ВАЛ-негативным реактивами антител добавляют по 0,3 мл каждого разведения вируса. Пробирки встряхивают, и смеси вирус/антитело инкубируют в течение 1 часа при 37°C. После этого смесями инокулируют 3-5-дневные культуры клеток RK-13,

представляющие собой монослой слитых клеток и находящиеся в культуральных колбах с поверхностью культивирования 25 см² или планшетах с многослойными стенками, наслаивая смеси поверх культур и используя по две колбы или лунки на каждое разведение вируса.

Каждую колбу инокулируют 0,25 миллилитрами смеси вирус/антитело, Придую колбу инокулируют 0,25 миллилитрами смеси вирус/антителоследует пропорционально пересчитать. Инокулированные колбы или планшеты инкубируют в течение 2 часов при 37нС, осторжно покачивая через 1 час после начала инкубации, для того, чтобы распределить инокулят поверх клеточных монослоев. Безторедварительного удаления инокулята и промывания монослоев клеток на монослой наслаивают среду, содержащую 0,75% карбоксиметилцеллюлозы и инкубируют в течение 4-5 дней при 37 С в аэробном термостате или термостате с увлажняемой атмосферой, содержащей 5% CO₂ в воздухе. После удаления среды монослой окрашивают раствором 0,1% кристаллического фиолетового, забуференного формалином. Подсчитывают бляшки, и методом Спирмана-Карбера определяют титр инфекционности вируса в присутствии и в отсутствии антител к ВАЛ. Подтверждение подлинности изолята основано на уменьшении количества бляшек не мене чем на 10² log вируса в присутствии антитело-позитивной сыворотки против штамма *Vesugus* вируса артериита лошадей.

При использовании описанной процедуры подавляющее большинство изолятов ВАЛ от жеребцов-носителей получают при первом пассаже в культуре клеток (Timoney & McCollum, 1993). Наличие в образцах цитотоксичности невирусного происхождения или бактериального загрязнения не являются существенной проблемой при попытках выделения этого вируса из спермы жеребца. Если наблюдается цитотоксичность невирусного происхождения, то она обычно поражает монослой, инокулированные разведением 10⁻¹ и намного реже 10⁻² семенной плазмы. Для преодоления этой проблемы успешно применяется обработка семенной плазмы полиэтиленгликолем (с молекулярной массой 6000) перед инокуляцией (Fukunaga *et al.*, 2000). Описанный метод предусматривает добавление полиэтиленгилколя к разведениям семенной плазмы от 10⁻¹ до 10⁻³, так чтобы конечная концентрация полиэтиленгликоля в каждом разведении составляла 10%. Смеси выдерживают в течение ночи при 4°C при легком перемешивании, затем центрифугируют в течение 30 минут при 2000 g и отбрасывают надосадочную жидкость. Осадки суспендируют в объеме поддерживающей культуральной среды, составляющем 1/10 первоначального объема разведений, и смеси гомогенизируют. Затем смеси центрифугируют в течение 30 минут при 2000 g, отбирают надосадочную жидкость и используют ее для инокуляции. Нет никаких данных, указывающих на снижение чувствительности процедуры выделения вируса из-за описанной предварительной обработки семенной плазмы (Fukunaga *et al.*, 2000). В случае проблем, вызванных бактериальным загрязнением образца, предпочтительно запросить повторно полученный образец спермы данного жеребца. При невозможности повторного получения образца может быть предпринята попытка устранения загрязнения посредством предварительной обработки образца антибиотиком, содержащим транспортную среду для образцов вируса, выдерживания его в течение ночи при 4°C с последующим ультрацентрифугированием и ресуспендированием осадка перед разведением образца и инокуляцией им культуры клеток.

Имеются два сообщения о неудавшихся попытках выделения ВАЛ из образцов двух разных жеребцов, в которых при ОТ-ПЦР была обнаружена вирусная нуклеиновая кислота. По крайней мере, в одном случае причиной неудавшейся детекции

инфекционного вируса могла быть очень высокая нейтрализующая активность семенной плазмы жеребца, что подчеркивает ценность применения ОТ-ПЦР в качестве вспомогательного метода детекции ВАЛ в дополнение к выделению вируса.

1.3. Детекция антигена

В тех случаях, когда летальность ассоциирована с предполагаемой вспышкой ИВАЛ, следует исследовать разнообразные ткани для получения гистологических доказательств панваскулита, который наиболее выражен в артериях и венах малого калибра во всем теле, особенно в слепой кишке, ободочной кишке, селезенке, лимфатических железах, ассоциированных с этими органами, и коре надпочечников (Crawford & Henson, 1973; Del Piero, 2000; Jones *et al.*, 1957). Патогномическим признаком ИВАЛ считают наличие диссеминированного некротизирующего артериита с вовлечением эндотелиальных и медиальных клеток пораженных сосудов. Однако у зрелого животного характерные поражения сосудов не являются выраженным признаком во многих случаях связанного с ВАЛ аборта.

Антиген ВАЛ может быть идентифицирован в разных тканях больных животных, как в присутствии, так и в отсутствие поражений (Del Piero, 2000). Продемонстрировано присутствие антигена в легких, сердце, печени, и селезенке и также в плаценте абортированных плодов (Del Piero, 2000). Для подтверждения острой инфекции ВАЛ также проводилось иммуногистохимическое исследование полученных при биопсии образцов кожи. Хотя этот подход имеет некоторую ценность, он не является полностью достоверным для диагностики заболевания. В цитоплазме инфицированных клеток вирусный антиген можно обнаружить методом иммунофлуоресценции при использовании конъюгированной поликлональной лошадиной сыворотки против ВАЛ (Crawford & Henson, 1973), либо иммунопероксидазным методом с авидин-биотиновым усилением (ABC) при использовании мышинных моноклональных антител к вирусным белкам GP5 или N (Del Piero, 2000).

1.4. Молекулярные методы

Стандартная двустадийная ОТ-ПЦР, одностадийная ОТ-ПЦР, ОТ-гнездовая ПЦР, и ОТ-ПЦР в реальном времени (рОТ-ПЦР) приобрели широкое признание в качестве методов анализа, альтернативных или вспомогательных, применяемых в дополнение к выделению вируса в культуре клеток для детекции ВАЛ в диагностических материалах. Анализы на основе ОТ-ПЦР позволяют идентифицировать вирус-специфичную РНК в клинических образцах, а именно, в фильтратах носоглоточных или назальных тампонов, лейкоцитарных пленках, необработанной и разбавленной сперме и моче и в патоморфологических образцах ткани (Balasuriya *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011; Westcott *et al.*, 2003;). Стандартная, одностадийная ОТ-ПЦР, ОТ-гнездовая ПЦР (ОТ-гПЦР) и рОТ-ПЦР TaqMan® в одной пробирке были разработаны и подвергнуты оценке в качестве методов детекции разнообразных штаммов вируса в жидкой фазе тканевой культуры, сперме и назальном секрете (Balasuriya *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011; Westcott *et al.*, 2003). Мишенями этих методов анализа являются шесть разных открытых рамок считывания (ОРС) в геноме ВАЛ (ОРС 1b, 3-7). Однако чувствительность и специфичность методов ОТ-ПЦР, использующих разные пары праймеров для разнообразных ОРС, существенно различаются. Результаты, сопоставимые с результатами выделения вируса, получены для некоторых, но не для всех анализов методом стандартной одностадийной ОТ-ПЦР, двустадийной ОТ-ПЦР, ОТ-гПЦР и рОТгПЦР TaqMan® в одной пробирке (Balasuriya *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 1997; Lu *et*

al., 2007; Miszczak *et al.*, 2011). По сравнению с традиционным методом выделения вируса, эти основанные на ОТ-ПЦР анализы часто более чувствительные и существенно более быстрые в выполнении, для завершения большинства из них требуется менее 24 часов. Другое преимущество анализов ОТ-ПЦР заключается в том, что для них не требуется жизнеспособный вирус. Применительно к ВАЛ рОТ-ПЦР, является простым, быстрым и достоверным методом обнаружения и идентификации вирусной нуклеиновой кислоты в сперме лошади и в жидкости тканевой культуры (Balasuriya *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011). Однако имеющиеся данные показывают, что выбор коммерческого набора для экстракции нуклеиновой кислоты и для амплификации может оказывать важнейшее влияние на общую диагностическую чувствительность и устойчивость анализа (Miszczak *et al.*, 2011). Это утверждение было продемонстрировано при использовании метода экстракции нуклеиновой кислоты и магнитных микросфер вместе со специфичными наборами для ОТ-ПЦР. рОТ-ПЦР в одной пробирке имеет следующие важные преимущества над стандартной двустадийной ОТ-ПЦР: 1) исключает возможность перекрестной контаминации между образцами и ранее амплифицированными продуктами, поскольку пробирку никогда не открывают; 2) снижает вероятность ложноположительных реакций в случае обнаружения продукта рОТ-ПЦР с помощью специфичного в отношении последовательности зонда. Однако в связи с высокой чувствительностью метода анализа ОТ-ПЦР и по причине отсутствия надлежащей защиты в лаборатории, существует потенциальная возможность перекрестного загрязнения образцов, приводящего к получению ложно-положительных результатов. Например, при применении анализа ОТ-гПЦР наряду с повышенной чувствительностью при детекции ВАЛ наблюдается вероятность ложно-положительных результатов. Применение ОТ-гПЦР сопровождается повышенным риском перекрестного загрязнения в связи со второй стадией амплификации, в которой используется продукт первой реакции ОТ-ПЦР. Для минимизации риска перекрестного загрязнения следует принять существенные меры предосторожности, особенно на этапах экстракции РНК и отработки реакции. В каждый анализ ОТ-ПЦР следует включить релевантные ВАЛ-позитивные и ВАЛ-негативные контроли матрицы и, если потребуются, нуклеиновую кислоту, экстрагированную из жидкости тканевой культуры неинфицированных клеток. Таким образом, в большинстве обстоятельств использование одностадийной ОТ-ПЦР или рОТ-ПЦР в одной пробирке позволит в значительной степени преодолеть проблемы, ассоциированные с перекрестным загрязнением.

Выбор праймера имеет критическое значение для чувствительности анализа ОТ-ПЦР с праймерами (и зонда в случае рОТ-ПЦР), которые предпочтительно конструировать из наиболее консервативной области(ей) генома ВАЛ. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей показал, что последовательности ОРС 1b (кодирует вирусную полимеразу), ОРС 6 (белок М) и 7 (белок N) более консервативны, чем другие ОРС среди проанализированных до настоящего времени штаммов ВАЛ из Северной Америки и Европы (Balasuriya *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007; Miszczak *et al.*, 2011; Westcott *et al.*, 2003). У различных штаммов ВАЛ наиболее консервативным геном является ОРС7, и праймеры, специфичные для ОРС7 (и зонд для рОТ-ПЦР) позволили обнаружить разнообразие штаммов вируса Европейского и Североамериканского происхождения (Balasuriya *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007). Кроме того, использование многочисленных пар праймеров, специфичных для разных ОРС 1b ([прямой: 5'-GAT-GTC-TAT-GCT-ССА-ТСА-ТТ-3' и обратный: 5'-GGC-GТА-GGC-ТСС-ААТ-ТГА-А-3']) и/или [прямой: 5'-ССТ-GAG-АСА-СТG-AGT-СGC-GT-3' и обратный 5'-ССТ-GAT-GCC-АСА-TGG-ААТ-GA-3']) (Gilbert *et al.*, 1997), ОРС 6

([прямой: 5'-CTG-AGG-TAT-GGG-AGC-CAT-AG-3' и обратный: 5'-GCA-GCC-AAA-AGC-ACA-AAA-GC-3']) и OPC 7 ([прямой 5'-ATG-GCG-TCA-AGA-CGA-TCA-CG-3' и обратный 5'-AGA-ATA-TCC-ACG-TCT-TAC-GGC-3']) заметно повышает шансы обнаружения Североамериканского и Европейского штаммов ВАЛ методом ОТ-ПЦР. Две пары праймеров, специфичных для OPC 1b, подходят для использования при анализе рОТ-ПЦР (Gilbert *et al.*, 1997). Хотя обнаружено, что ОТ-ПЦР обладает высокой чувствительностью при детекции нуклеиновой кислоты в необработанной сперме, согласно имеющимся данным, этот же метод не отличается равноценной достоверностью при анализе криоконсервированной спермы с очень низкой инфекционностью вируса (Zhang *et al.*, 2004).

В дополнение к описанным выше анализам ОТ-ПЦР, описано применение двух вариантов в одной пробирке с флюорогенным зондом TaqMan® для детекции нуклеиновой кислоты ВАЛ (Balasuriya *et al.*, 2002); праймеры ([прямой: 5'-GGC-GAC-AGC-СТА-СAA-GCT-ACA-3', обратный: 5'-CGG-CAT-CTG-CAG-TGA-GTG-A-3'] и зонд [5'FAM-TTG-CGG-ACC-CGC-ATC-TGA-CCA-A-TAMRA-3'] и (Westcott *et al.*, 2003); праймеры [прямой: 5'-GTA-CAC-CGC-AGT-TGG-TAA-CA-3', обратный: 5'-ACT-TCA-ACA-TGA-CGC-CAC-AC-3'] и зонд [5'FAM-TGG-TTC-ACT-CAC-TGC-AGA-TGC-CGG-TAMRA-3']). Однако следует отметить, что изменчивость генома полевых изолятов ВАЛ может приводить к снижению чувствительности анализов ОТ-ПЦР и рОТ-ПЦР, даже если праймеры и зонд основаны наиболее консервативной области генома ВАЛ (OPC 7 [Lu *et al.*, 2007]). Филогенетические исследования штаммов ВАЛ из определенных регионов/стран подтвердили существование кластеров изолятов, характеризующихся более близким родством между собой, по сравнению с вирусными штаммами с различным географическим происхождением (Mankos *et al.*, 2007). В таких обстоятельствах валидированные праймеры, помимо уже рекомендованных, могут оказаться более подходящими для детекции этих штаммов ВАЛ с несходными геномами.

В отсутствие имеющего широкое распространение соглашения по поводу универсального набора праймеров для ВАЛ, и в связи с тем, что ни один анализ ОТ-ПЦР не позволяет определить фактическую инфекционность образца, для идентификации вируса в клинических и патоморфологических образцах и при наличии соответствующих указаний, для геномного и фенотипического анализа изолятов вируса, целесообразно выполнять выделение вируса во взаимодействии с ОТ-ПЦР или рОТ-ПЦР.

Штамма ВАЛ, выделенные в разных регионах мира, подразделены на филогенетические группы на основании анализа последовательностей генов GP3, GP5 и гена белка оболочки М (OPC 3, 5 и 6, соответственно) и гена белка нуклеокапсида (N) (OPC 7 [Balasuriya *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2010]). Обнаружено, что для этой цели наиболее полезным и достоверным является ген GP5. Взаимосвязи между штаммами, демонстрируемые при определении нуклеотидной последовательности, являются полезным молекулярным и эпидемиологическим инструментом для прослеживания происхождения вспышек ИВАЛ (Balasuriya *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2010).

2. Серологические исследования

Исследована возможность детекции антител к ВАЛ с помощью разнообразных серологических реакций. В число этих реакций входит реакция нейтрализации (микронейтрализации [Senne *et al.*, 1985] и реакция редукции бляшек [McCullum,

1970]), реакция связывания комплемента (РСК) (Fukunaga & McCollum, 1977), непрямой метод флуоресцирующих антител (Crawford & Henson, 1973), иммунодиффузия в агаровом геле (Crawford & Henson, 1973), твердофазный ИФА (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000) и иммуноанализ с использованием флуоресцентных микросфер (ИАМ) (Go *et al.*, 2008).

Интересно, что до настоящего времени подтвержден лишь один мажорный серотип ВАЛ, представленный прототипным штаммом *Bucyrus* (ATCC VR 796) (McCcollum, 1970; Timoney & McCollum, 1993). При использовании стандартных протоколов иммунизации получены лошадиная и кроличья антисыворотки к неочищенному ВАЛ. Также разработаны мышинные моноклональные антитела и моноспецифичные кроличьи антитела к белку нуклеокапсида (N), мажорному гликопротеину оболочки (GP5) и негликозилированному белку оболочки (M) вируса артериита лошадей (Balasuriya *et al.*, 1997).

2.1. Реакция комплемент-зависимой нейтрализации вируса

В настоящее время реакция комплемент-зависимой микронеutralизации находит самое широкое международное применение для диагностики ВАЛ-инфекции, исследований серопревалентности и проверки лошадей перед перемещением. Этот метод использовали также для скрининга крови из сердца плода с целью ретроспективной диагностики случаев связанного с ИВАЛ аборта. После естественного заражения или вакцинации живой ослабленной вакциной против ИВАЛ нейтрализующие антитела к ВАЛ сохраняются в течение нескольких лет (Timoney & McCollum, 1993).

2.2. Реакция нейтрализации вируса

Реакция нейтрализации вируса используется в диагностических целях для подтверждения инфекции в предполагаемых случаях/вспышках ИВАЛ и для скрининга лошадей, например, жеребцов, на наличие признаков ВАЛ-инфекции. В настоящее время наиболее широкое применение получила методика, разработанная Лабораторией Национальной ветеринарной службы при Министерстве сельского хозяйства Соединенных Штатов Америки (Senne *et al.*, 1985). Важно получить стерильный образец крови, потому что бактериальное загрязнение сыворотки может стать причиной искажения результата анализа. Рекомендуется проводить реакцию на клетках RK-13 и использовать одобренный штамм ВАЛ CVL-*Bucyrus* (Weybridge) в качестве референтного вируса⁴ (Edwards *et al.*, 1999). Хотя этот штамм был первоначально получен из прототипного вируса *Bucyrus*, история пассирования штамма CVL (Weybridge) не полностью документирована. Основной референтный вирус выращивают в линии клеток RK-13, осветляют, осаждая клеточный дебрис, низкоскоростным центрифугированием и после разделения на аликвоты хранят при -70°C. Несколько замороженных аликвот размораживают и определяют инфекционность основного вируса титрованием в клетках RK-13. На чувствительность реакции НВ, применяемой для детекции антител к ВАЛ, могут существенно влиять несколько факторов, в особенности, источник и история пассирования используемого вирусного штамма (Edwards *et al.*, 1999). Штамм CVL-*Bucyrus* (Weybridge) и в высокой степени ослабленный вакцинный штамм ОЖВК вируса артериита лошадей демонстрируют сопоставимую чувствительность при детекции позитивной сыворотки с низким титром,

⁴ Штамм можно приобрести в Справочной лаборатории МЭБ, в которой проводится изучение инфекции вирусом артериита лошадей, в Соединенном Королевстве (подробная информация о контактах представлена на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

в особенности полученной у вакцинированных против ИВАЛ лошадей. Продолжаются усилия, направленные на большее единообразие протоколов исследования и результатов серологических реакций в разных лабораториях, которые выполняют реакции НВ или проводят другие сопоставимые серологические анализы данной инфекции. В МЭБ можно приобрести одобренные стандартные сыворотки для ВАЛ⁵, способствующие международной стандартизации реакции микронеutralизации и твердофазного ИФА.

2.1.1. Методика

i) Сыворотки инактивируют в течение 30 минут на водяной бане при 56°C (контрольные сыворотки, однократно).

ii) В 96-луночном, плоскодонном титрационном микропланшете для культуры клеток выполняют последовательные двукратные разведения инактивированных исследуемых сывороток в бессывороточной культуральной среде (объемы 25 мкл), начиная с разведения сыворотки 1/2 и используя ряды лунок в двух повторностях для каждой исследуемой сыворотки. Первоначально большинство сывороток проверяют в разведении 1/4 и 1/8 (т.е. в последнем разведении сыворотки после добавления в каждую лунку равного объема соответствующего разведения исходного вируса). При желании можно повторить тестирование образцов, позитивных в разведении 1/8, и титровать их до определения конечной точки. В каждый эксперимент следует включать индивидуальные контрольные сыворотки, наряду с негативной и позитивными контрольными сыворотками с известными низким титром и высоким титром.

iii) Готовят разведение исходного вируса, которое должно содержать от 100 до 300 TCID₅₀ (50% дозы, инфицирующей культуру ткани) в 25 мкл, используя разбавитель, бессывороточную культуральную среду, содержащую антибиотики и свежий комплемент морской свинки или кролика в конечной концентрации 10%.

iv) На каждом планшете в каждую лунку, содержащую по 25 мкл каждого разведения сыворотки, вносят по 25 мкл соответствующего разведения исходного вируса, кроме лунок, предназначенных для контроля токсичности исследуемой сыворотки, и лунок с контролем клеток.

v) Для подтверждения достоверности результатов эксперимента включают обратное титрование вируса – рабочего разведения исходного вируса, используя 4 лунки для каждого 10-кратного разведения.

vi) Планшеты закрывают крышками и легко встряхивают, чтобы способствовать перемешиванию смесей сыворотка/вирус.

vii) Планшеты инкубируют в течение 1 часа при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в воздухе.

⁵ Сыворотки можно приобрести в Справочной лаборатории МЭБ, Бжно приобрести в Справочной лаборатории ise/reference-laborator, в Соединенных Штатах Америки (подробная информация о контактах представлена на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>)

viii) Готовят суспензию клеток из 3-5 дневных культур клеток RK-13, используя концентрацию, которая обеспечит образование слитых монослоев клеток в лунках титрационного микропланшета через 18-24 часа после посева.

ix) В каждую лунку вносят по 100 мкл клеточной суспензии, планшеты накрывают крышками, крышки запечатывают липкой лентой и легко встряхивают.

x) Планшеты инкубируют при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в воздухе.

xi) Через 12-18 часов после начала инкубации под микроскопом регистрируют показания планшетов для выявления невирусного ЦПЭ, и через 48-72 часа после начала инкубации показания регистрируют повторно для выявления вирусного ЦПЭ. Достоверность результатов эксперимента подтверждена, если установлено, что рабочее разведение исходного вируса содержало 30-300 TCID₅₀, и что титры положительных контрольных сывороток отличается от заданных титров не более чем на 0,3 log₁₀.

Разведение сыворотки признают положительным, если вирусный ЦПЭ в лунках с исследуемой сывороткой снизился на 75% или более по сравнению с лунками с самым низким разведением контроля вируса. Затем, используя метод Спирмана-Карбера, рассчитывают конечные точки. Позитивным считается титр 1/4 или выше. Для самого низкого изученного разведения негативной сыворотки должны быть получены лишь следы (менее 25%) нейтрализации вируса, либо отсутствие нейтрализации вируса. В некоторых случаях титры антител бывает трудно определить, поскольку может наблюдаться частичная нейтрализация в диапазоне нескольких разведений сыворотки. Довольно часто приходится сталкиваться с сыворотками, которые вызывают токсические изменения в нижних изученных разведениях. В таких случаях установить, каким был пациент: негативным или позитивным с низким титром установить невозможно. Для решения этой проблемы следует повторить тестирование токсичного образца, используя титрационные микропланшеты со слитыми монослоями клеток RK-13, засеянные днем раньше. Кроме того, токсичность в образцах сыворотки может быть снижена или удалена, если перед тестированием адсорбировать образец суспензией клеток RK-13, или заменить комплемент морской свинки на комплемент кролика в разбавителе для вируса. Может выясниться, что в сыворотках будет выявлено более одного типа цитотоксичности. При оценке сывороток, вызвавших не вирусную цитотоксичность, следует учитывать статус вакцинации против герпесвируса лошадей. Показано, что одна из вакцин против герпесвируса у лошадей, которую в настоящее время можно приобрести в Европе, стимулирует образование антител к клеткам почки кролика, используемым при производстве вакцины. Эти антитела, в свою очередь, вызывают цитотоксичность, обычно в разведении сыворотки от 1/4 и/или 1/8, но в некоторых случаях и в более высоких разведениях, и осложняют интерпретацию результатов анализа (Newton *et al.*, 2004).

2.2. Твердофазный иммуоферментный анализ

Для детекции антител к ВАЛ разработано несколько вариантов прямого или непрямого твердофазного ИФА (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000). Эти методы основаны на использовании очищенного вируса или вирусных антигенов рекомбинантного происхождения. Полезность ранних вариантов этого метода была ограничена частотой ложноположительных реакций. Последние были ассоциированы с присутствием в сыворотке лошадей антител к разнообразным

антигенам культуры ткани. После того как была установлена важность вирусного белка GP5 для стимуляции гуморального ответа на ВАЛ, началась разработка нескольких вариантов твердофазного ИФА, в которых используют часть рекомбинантного белка или полностью рекомбинантный белок, полученный в бактериальной системе экспрессии или системе бакуловируса. (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998). Позднее использовали конъюгированный с овалбумином синтетический пептид, содержащий аминокислоты 81-106 белка GP5 (Nugent *et al.*, 2000). Некоторые из этих методов анализа были сопоставимыми с реакцией НВ с точки зрения чувствительности и специфичности, и обеспечивали обнаружение ВАЛ-специфичных антител раньше, чем достигалась положительная реакция реакции НВ. Однако в некоторых из этих анализов возможны ложно-отрицательные реакции. В результате скрининга случайной пептидной библиотеки фага поликлональной сывороткой, полученной у ВАЛ-инфицированных лошадей, были идентифицированы и очищены лиганды, используемые теперь в качестве антигена при применении твердофазного ИФА для ВАЛ. Однако корреляция между полученными при проведении этого анализа значениями оптической плотности и титрами нейтрализующих антител отсутствовала; это означает, что обнаруженные антитела направлены в основном против неповерхностных эпитопов вируса. Твердофазный ИФА, основанный на использовании комбинации структурных белков GP5, М или N вируса артериита лошадей, экспрессируемых рекомбинантными бакуловирусами, обеспечивал успешную детекцию антител к вирусу у лошадей с естественной или экспериментальной инфекцией, но не у животных, вакцинированных ИВАЛ (Hedges *et al.*, 1998). Применительно к применению твердофазного ИФА, основанного на белке GP5, для анализа ВАЛ, важно отметить, что чувствительность анализа будет варьировать в зависимости от последовательности(ей) используемого в анализе эктодомена данного вирусного белка. Обнаружено, что для изолятов ВАЛ характерна существенная изменчивость аминокислотной последовательности в пределах данного домена. Чтобы максимизировать чувствительность твердофазного ИФА, основанного на белке GP5, может потребовать включить многочисленные последовательности эктодомена, репрезентативные для известных фенотипически различных изолятов ВАЛ вместо использования одной единственной последовательности эктодомена. Два описанных позднее варианта твердофазного ИФА наиболее перспективны в качестве достоверных серодиагностических анализов ВАЛ-инфекции (Cho *et al.*, 2000; Nugent *et al.*, 2000). Сообщается что чувствительность и специфичность блокирующего твердофазного ИФА с использованием моноклональных антител к белку GP5 составляют 99,4% и 97,7%, соответственно, по сравнению с реакцией НВ (Cho *et al.*, 2000). Другой твердофазный ИФА, в котором используется синтетический пептид GP5, конъюгированный с овалбумином, продемонстрировал чувствительность и специфичность 96,75% и 95,6%, соответственно, при использовании панели, включающей 400 позитивных и 400 негативных сывороток, согласно данным реакции НВ (Nugent *et al.*, 2000). В отличие от реакции НВ, в лучшем случае немногие из многочисленных разработанных вариантов твердофазного ИФА (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000) прошли экстенсивную валидацию, хотя некоторые из них обеспечивают почти сопоставимую чувствительность и специфичность (Cho *et al.*, 2000; Hedges *et al.*, 1998; Nugent *et al.*, 2000). Следует отметить, что в отличие от реакции НВ, положительный результат твердофазного ИФА необязательно отражает защитный иммунный статус конкретной лошади в отношении ВАЛ, поскольку учитывает как нейтрализующие, так и не нейтрализующие антитела.

2.3. Реакция связывания комплемента

В прошлом РСК использовали для диагностики недавней инфекции ВАЛ, основываясь на относительно непродолжительном существовании связывающих комплемент антител (Fukunaga & McCollum, 1977). В настоящее время этот метод в значительной степени уступил место реакции НВ и различным вариантам твердофазного ИФА, применяемым в надзорных исследованиях и при для тестирования лошадей перед перемещением.

2.4. Иммуноанализ с использованием флуоресцентных микросфер

Иммуноанализ с флуоресцентными микросферами разработан для детекции лошадиных антител к основным структурным белкам ВАЛ (Go *et al.*, 2008). Этот метод основан на клонировании и экспрессии отдельных полноразмерных мажорных белков (GP5, M, N), и также для определения части последовательности каждого структурного белка и включения их в отдельные анализы. При проведении различных иммуноанализов использовали прибор Luminex. Наилучшие результаты получены при частичном анализе белка GP5; чувствительность и специфичность этого метода составили 92,6% и 93,9%, соответственно, по сравнению с реакцией НВ.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

Разработаны несколько экспериментальных и коммерческих вакцин против ИВАЛ. В настоящее время на рынке присутствуют две вакцины, которые получают в культуре ткани (культуральные вакцины). Первая вакцина представляет собой ослабленную живую вирусную вакцину (ОЖВК), и вторая – инактивированную вакцину с добавлением адьюванта. Вакцина ОЖВК поступает в продажу в США и Канаде и используется под контролем со стороны министерства в Аргентине и Новой Зеландии. Инактивированная вакцина лицензирована для коммерческого применения в некоторых европейских странах, включая Данию, Францию, Германию, Венгрию, Ирландию, Швецию и Соединенное Королевство. Показания к применению этих вакцин заключаются в предотвращении вспышек ИВАЛ, включая аборт у жеребых кобыл и формирование состояния носительства у жеребцов. Поскольку жеребец-носитель считается основным резервуаром ВАЛ, сокращение численности носителей со временем должно привести к улучшению контроля над ИВАЛ и, в конечном счете, может способствовать ликвидации заболевания в определенных странах. Вакцину ОЖВК получают из вируса, ослабленного для лошадей в результате многократных серийных переносов в первичных клетках лошади и кролика и в линии клеток кожи лошади (Doll *et al.*, 1968; McCollum, 1970). Эта вакцина одобрена для применения на жеребцах, нежеребых кобылах и неплеменных лошадях. В то время как неплеменных лошадей можно вакцинировать в любое время, жеребцов и кобыл следует вакцинировать не менее чем за 3 недели до спаривания. Эту вакцину не рекомендуется вводить жеребым кобылам, особенно в последние 2 месяца беременности, жеребят моложе 6 недель, кроме ситуаций, когда существует значимый риск контакта с естественной инфекцией.

Вторая коммерческая вакцина против ИВАЛ представляет собой инактивированный препарат, полученный из вируса, выраженного в культуре клеток лошади, отфильтрованного, инактивированного химическими методами и затем соединенного с

метаболизирuемым адьювантом. Эта вакцина одобрена для введения племенным и неплеменным лошадям. В настоящее время эту вакцину не рекомендуется использовать для вакцинации жеребых кобыл из-за отсутствия соответствующих данных по безопасности.

В Японии разработана еще одна инактивированная вакцина против ИВАЛ, которая находится на хранении и будет распространена в случае вспышки ИВАЛ в этой стране. Продемонстрирована эффективность и безопасность этой водной, инактивированной формалином вакцины, при использовании ее на неплеменных и племенных лошадях. Для оптимальной иммунизации этой вакциной лошадям требуется первый курс, включающий 2 инъекции с 4-недельным интервалом, с последующим назначением бустерной дозы через каждые 6-12 месяцев. Поскольку вакцина не поступает в продажу, информацию о ее производстве привести невозможно.

2. Описание получения и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристика посевного вируса

ОЖВК и инактивированную коммерческую вакцину получают из прототипного штамма *Vesivirus* вируса артериита лошадей (ATCC VR 796), экспериментального варианта изолята из фетального легкого, который был выделен в 1953 г. во время вспышки респираторного заболевания и абортuв недалеко от города Бацирус, штат Огайо, США (Doll *et al.*, 1957). Согласно имеющимся данным, существует лишь один основной серотип этого вируса, и варианты штаммов признаны незначимыми для эффективности вакцины (McCollum, 1970; Timoney & McCollum, 1993).

2.1.1. Биологические характеристики главного посевного вируса

Прототипный вирус ОЖВК (ATCC VR 796) был ослаблен последовательным пассированием в первичных культурах почки лошади (HK-131), почки кролика (RK-111), и в линии диплоидных клеток кожи лошади, ATCC CCL57 (ECID-24) (Doll *et al.*, 1968; McCollum, 1970). В результате использования этой вакцины показано, что вирус является безопасным и иммуногенным между 80-м и 111-м пассажем в первичной линии клеток почки кролика (Doll *et al.*, 1968; McCollum, 1970).

Инактивированная вакцина с добавлением адьюванта получена из неослабленного прототипного штамма *Vesivirus* *tivated adjuvant* (ATCC VR 796), очищенного и подвергнутого четвертому последовательному пассированию в линии диплоидных клеток кожи лошади (ECID-4). После выращивания в культуре клеток вирус очищают фильтрованием с последующей химической инактивацией и добавлением адьюванта.

Вирус, предназначенный для ОЖВК и инактивированной вакцины, следует выращивать в стабильной культуре клеток, например, клетках кожи лошади, с использованием надлежащей среды с добавлением стерильной сыворотки КРС или бычьего сывороточного альбумина, который может применяться вместо сыворотки КРС в питательной среде. Перед инокуляцией вирусом клеточные монослои следует промыть для удаления сыворотки КРС. В течение 2-3 дней должен быть достигнут экстенсивный рост вируса, о котором свидетельствует появление цитопатических изменений в 80-100% клеток. Серии главного посевного вируса каждой вакцины поддерживают в жидком азоте или равноценных условиях.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних агентов)

Испытания вакцины на стерильность, чистоту и отсутствие контаминации посторонними агентами описаны в главе 1.1.9 *Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации*.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Вирусные штаммы для ОЖВК и инактивированных вакцин следует выращивать в соответствующей культуре клеток, официально одобренной для получения вакцины и продемонстрировавшей отсутствие посторонних бактерий, грибов, микоплазмы и вирусов (Moore, 1986). Подлинность вакцинного вируса, содержащегося в главном посевном материале, следует подтвердить нейтрализацией гомологичной сывороткой против ВАЛ. Научно документировано, что гомологичная лошадиная или кроличья антисыворотка вызывают неполную нейтрализацию ВАЛ (Moore, 1986; Senne *et al.*, 1985), которая является проблемой при скрининге главного посевного вируса на предмет посторонних вирусов и при попытке подтвердить подлинность вакцинного вируса. Проблему удалось решить посредством снижения титра инфекционности главного посевного вируса ниже уровня, требуемого для получения посевного вируса, перед проведением реакции нейтрализации разбавленного вируса. Смеси вируса/сыворотка тестируют для выявления остаточного живого вируса, выполняя серийное пассирование. Попытки выделения вируса в культуре клеток показали, что признаки цитопатических вирусов, гемадсорбирующих вирусов и нецитопатических штаммов вируса диареи КРС должны отсутствовать. Если используются клетки, имеющие лошадиное происхождение, необходимо подтвердить отсутствие в них вируса инфекционной анемии лошадей. В настоящее время при скрининге на занесенных агентов традиционные методы, например, ПЦР и твердофазный ИФА с захватом антитела, применяются чаще, чем посев и выделение вируса.

2.2. Способ получения вакцины

2.2.1. Методика

ОЖВК и инактивированные вакцины получают посредством культивирования соответствующих посевных вирусов в клетках кожи лошади. Клеточные монослои следует промыть перед инокуляцией посевным вирусом, чтобы удалить следы сыворотки КРС из поддерживающей рост клеток среды. Инокулированные культуры следует поддерживать на соответствующей поддерживающей среде. К сбору инфицированных культур следует переходить, когда почти на всем слое клеток будет заметен ЦПЭ. Надосадочную жидкость и клетки собирают и осветляют, удаляя клеточный дебрис и нежелательный материал фильтрованием. В случае инактивированной вакцины очищенный вирус инактивируют химическими методами и добавляют метаболизируемый адъювант. В ОЖВК и инактивированную вакцины в качестве консервантов добавляют неомицин, полимицин В и амфотерицин В.

2.2.2. Требования к ингредиентам

См. главу 1.1.8 *Принципы получения ветеринарных вакцин*, в которой основное внимание сосредоточено на продуктах биологического происхождения, связанных с незначительным риском.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

ОЖВК и инактивированные вакцины должны быть получены в стабильной линии клеток, которые были протестированы на подлинность и отсутствие посторонних бактерий, грибов, микоплазмы и других занесенных агентов. В дополнение к допроизводственной проверке главного посевного вируса для каждой вакцины и линии

клеток на занесенное загрязнение, культуры клеток, инфицированные соответствующими вакцинными вирусами, в инкубационном периоде необходимо исследовать макроскопически для выявления потенциальных признаков роста микроорганизмов или другое постороннее загрязнение. Если визуальное исследование не позволяет достоверно установить рост в сосуде для культивирования, следует выполнить пересев, микроскопическое исследование или и то, и другое.

2.2.4. Испытания партии готового препарата

i) Стерильность

Испытания на стерильность и отсутствие загрязнения биологическими материалами описано в главе 1.1.9. Каждую производственную партию ОВЖК и инактивированной вакцины следует проверить на наличие постороннего загрязнения бактериями, грибами и микоплазмой.

ii) Безопасность

Вакцину следует проверить, не подвергая животных риску, выполнив с этой целью внутримышечную инъекцию одной дозы вакцины, приготовленной из лиофилизированного вируса, не менее чем двух лошадям, в сыворотке которых отсутствуют нейтрализующие антитела к ВАЛ (Moore, 1986). Ни у одной из инокулированных лошадей не должны развиваться клинические признаки заболевания, за исключением легкой пирексии в течение последующего 2-недельного периода наблюдения. Преходящие местные реакции могут наблюдаться менее чем у 10% лошадей, инокулированных любой из перечисленных двух вакцин. Дополнительно у каждой лошади следует ежедневно получать носоглоточные мазки для попыток выделения вируса; содержание лейкоцитов и температуру тела следует тоже определять ежедневно. После вакцинации не должны наблюдаться значимые фебрильные изменения и изменения картины крови (Timoney & McCollum, 1993). У некоторых лошадей в первые 7 дней после вакцинации может быть продемонстрировано ограниченное выделение вакцинного вируса через дыхательные пути и со спермой. Данные о персистенции вакцинного вируса в половых путях вакцинированных жеребцов отсутствуют (Timoney & McCollum, 1993).

Для того чтобы гарантировать полную инактивацию вакцинного вируса следует проверить каждую производственную партию инактивированной вакцины на присутствие жизнеспособного вируса; с этой целью выполняют три последовательных пассажа в клетках кожи лошади и перед добавлением адьюванта выполняют окрашивание прямым методом флуоресцирующих антител, используя специфичный конъюгат с ВАЛ. После этого проводится проверка безопасности на морских свинках и мышах.

iii) Активность партии вакцины

Активность вакцины, расфасованной в окончательную упаковку, определяют методом анализа инфекционности бляшек в монослойной культуре клеток кожи лошади и также посредством экспериментального заражения вакцинированных лошадей (Moore, 1986). В культуре клеток испытания вакцины проводят в трех повторностях; рассчитывают средний титр инфекционности и определяют дозу, исходя из того, что каждая доза вакцины должна содержать не менее 3×10^4 бляшкообразующих единиц ослабленного ВАЛ. Для оценки *in-vivo* активности ОЖВК и инактивированных вакцин выполняют одно испытание, представляющее собой экспериментальное заражение 17-20 вакцинированных и 5-7 контрольных лошадей, либо два испытания, каждое из которых

включает экспериментальное заражение 10 вакцинированных и 5 контрольных лошадей. Концентрация вирусного антигена в инактивированной вакцине более чем тысячекратно превышает концентрацию вирусного антигена в ослабленной живой вирусной вакцине.

2.3. Требования к одобрению/регистрации/лицензированию

2.3.1. Производственный процесс

Для регистрации вакцины следует представить в официальные органы всю важную информацию, касающуюся производства вакцины и контроля качества. Необходимо представить информацию о трех последовательных партиях размером не менее 1/3 типичной производственной партии.

2.3.2 Требования безопасности

Производитель ОЖВК рекомендует разовую дозу вакцины, назначаемую внутримышечно в качестве первичной вакцинации с последующей ежегодной ревакцинацией. Рекомендуемая схема вакцинации инактивированной вакциной, предназначенной для внутримышечного введения представляет собой первичный курс, включающий две вакцинации с 3-6 недельным интервалом, с последующей ревакцинацией через каждые 6 месяцев.

i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

ОЖВК считается безопасной для жеребцов и нежеребых кобыл. Нет никаких данных, указывающих на способность вакцинного вируса вызывать состояние носительства у вакцинированных жеребцов. ОЖВК не рекомендуется использовать у жеребых кобыл или жеребят моложе 6 недельного возраста. Несмотря на указанные производителем противопоказания, данную вакцину использовали у жеребых кобыл в первые два триместра без каких-либо нежелательных последствий. Вакцинация кобыл во время двух последних месяцев жеребости сопровождается риском абортa. Инактивированная вакцина безопасна для племенных и неплеменных животных. В связи с отсутствием достаточных данных по безопасности в настоящее время не рекомендуется назначать вакцину жеребым кобылам.

ii) Реверсия вирулентности ослабленных живых вакцин и экологические требования

В экспериментальных и экстенсивных полевых исследованиях, проведенных после появления на рынке коммерческой ОЖВК в 1985 г., не было получено данных, указывающих на реверсию вирулентности вакцины или на рекомбинацию с природными штаммами ВАЛ (Timoney & McCollum, 1993).

iii) Меры предосторожности

Производитель ОЖВК и инактивированных вакцин предоставляет достаточную информацию о рекомендованном применении каждой вакцины, включая некоторые противопоказания к применению ОЖВК, на листах-вкладышах в упаковку соответствующей вакцины. Обе вакцины безвредны для вакцинаторов.

2.3.3. Требования к эффективности

Оценка эффективности ОЖВК и инактивированных вакцин выполнена в исследованиях экспериментального заражения вакцинированных животных. Эти исследования включали заражение через органы дыхания группы впервые вакцинированных лошадей после первичной иммунизации вирулентным прототипным штаммом *Virusus* ВАЛ. Уровень защитного иммунитета, развившегося в результате вакцинации, оценивали на

основании отсутствия клинических признаков ИВАЛ у животных, подвергнутых экспериментальному заражению, или значимому уменьшению тяжести заболевания по сравнению с наблюдавшимся у невакцинированных контрольных животных. Аналогичным образом оценивали эффективность вакцинации применительно к предотвращению формирования состояния носительства у вакцинированных жеребцов.

2.3.4. Продолжительность иммунитета

У большинства лошадей обнаружимые титры нейтрализующих антител к ВАЛ должны развиваться в течение 1-2 недель после применения вакцин ОЖВК (Timoney & McCollum, 1993). В двух исследованиях описаны противоречивые результаты первичной вакцинации. В одном исследовании вакцинации жеребцов наблюдали быстрое снижение титров антител у значимого количества животных, у которых в течение 1-3 месяцев после вакцинации произошла реверсия к серонегативности. С другой стороны, в других исследованиях охарактеризован отличный длительный ответ с сохранением высоких уровне нейтрализации вируса в течение, по крайней мере, 1-2 лет. Ревакцинация этой вакциной приводит к отличному анамнестическому ответу с развитием высоких титров антител, остававшихся относительно без снижения в течение нескольких лет (Timoney & McCollum, 1993).

Экспериментальные исследования показали, что у большинства лошадей, вакцинированных инактивированной вакциной, к 14-му дню после второй вакцинации развиваются низкие или средние титры нейтрализующих антител к ВАЛ. Опубликованная информация о продолжительности иммунитета, вызванного данной вакциной, отсутствует.

2.3.5. Стабильность

Лиофилизированная ОВЖК может храниться не менее 3-4 лет при температуре 2-7°C без потери инфекционности, при условии хранения в темноте. В случае хранения вакцины при температуре -20°C или ниже инфекционность сохраняется в течение значительно более долгого времени. Однако после восстановления влажности вакцину следует использовать в течение 1 часа или уничтожить. Инактивированная вакцина хранится в форме жидкой суспензии при 2- 8°C без потери активности, при условии хранения в защищенном от света месте.

ЛИТЕРАТУРА

BALASURIYA U.B.R., EVERMANN J.F., HEDGES J.F., MCKEIRNAN A.J., MITTEN J.Q., BEYER J.C., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & MACLACHLAN N.J. (1998). Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine arteritis virus isolated from infective frozen semen and an aborted equine fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **213**, 1586–1589.

BALASURIYA U.B.R., LEUTENEGGER C.M., TOPOL J.B., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & MACLACHLAN N.J. (2002). Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan® reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Methods*, **101**, 21–28.

BALASURIYA U.B.R., PATTON J.F., ROSSITO P.V., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H. & MACLACHLAN N.J. (1997). Neutralization determinants of laboratory strains and field

isolates of equine arteritis virus: Identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain. *Virology*, **232**, 114–128.

CAVANAGH D. (1997). *Nidovirales*: A new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch. Virol.*, **142**, 629–633.

CHO H.J., ENTZ S.C., DEREGT D., JORDAN L.T., TIMONEY P.J. & MCCOLLUM W.H. (2000). Detection of antibodies to equine arteritis virus by a monoclonal antibody-based blocking ELISA. *Can. J. Vet. Res.*, **64**, 38–43.

CRAWFORD T.B. & HENSON J.B. (1973). Immunofluorescent, light microscopic and immunologic studies of equine viral arteritis. Proceedings of the Third International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1972. Karger, Basel, Switzerland, 282–302.

DEL PIERO F. (2000). Equine viral arteritis. *Vet. Pathol.*, **37**, 287–296.

DOLL E.R., BRYANS J.T., MCCOLLUM W.H. & CROWE M.E.W. (1957). Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion of mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.*, **47**, 3–41.

DOLL E.R., BRYANS J.T., WILSON J.C. & MCCOLLUM W.H. (1968). Immunisation against equine viral arteritis using modified live virus propagated in cell cultures of rabbit kidney. *Cornell Vet.*, **48**, 497–524.

EDWARDS S., CASTILLO-OLIVARES J., CULLINANE A., LABLE J., LENIHAN P., MUMFORD J.A., PATON D.J., PEARSON J.E., SINCLAIR R., WESTCOTT D.G.F., WOOD J.L.N., ZIENTARA S. & NELLY M. (1999). International harmonisation of laboratory diagnostic tests for equine viral arteritis. Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, UAE, 1998, 359–362.

FUKUNAGA Y. & MCCOLLUM W.H. (1977). Complement fixation reactions in equine viral arteritis. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 2043–2046.

FUKUNAGA Y., WADA R., SUGITA S., FUJITA Y., NAMBO Y., IMAGAWA H., KANEMARU T., KAMADA M., KOMATSU N. & AKASHI H. (2000). *In vitro* detection of equine arteritis virus from seminal plasma for identification of carrier stallions. *J. Vet. Med. Sci.*, **62**, 643–646.

GILBERT S.A., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H. & DEREGT D. (1997). Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions using a sensitive nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2181–2183.

GO Y.Y., WONG S., BRANSCUM A., DEMAREST V.L., SHUCK K.M., VICKERS M.L., ZHANG J., MCCOLLUM W.H., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. (2008). Development of a fluorescent microsphere immunoassay for detection of antibodies specific to equine arteritis virus and comparison with the virus neutralization test. *Clin. Vaccine Immunol.*, **15**, 76–87.

HEDGES J.F., BALASURIYA U.B.R., SHABBIR A., TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H., YILMA T. & MACLACHLAN N.J. (1998). Detection of antibodies to equine arteritis virus

by enzyme linked immunosorbant assays utilizing GL, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses. *J. Virol. Methods*, **76**, 127–137.

JONES T.C., DOLL E.R. & BRYANS J.T. (1957). The lesions of equine viral arteritis. *Cornell Vet.*, **47**, 52–68.

KONDO T., FUKUNAGA Y., SEKIGUCHI K., SUGIURA T. & IMAGAWA H. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of equine arteritis virus in racehorses. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 1043–1045.

LITTLE T.V., DEREGT D., MCCOLLUM W.H., & TIMONEY P.J. (1995). Evaluation of an immunocytochemical method for rapid detection and identification of equine arteritis virus in natural cases of infection. Proceedings of the Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, Japan, 1994, 27–31.

LU Z., BRANSCUM A., SHUCK K.M., ZHANG J., DUBOVI E., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. (2007). Detection of equine arteritis virus nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid. *J. Vet. Diagn. Invest.*

MANKOC S., HOSTNIK P., GROM J., TOPLAK I., KLOBUCAR I., KOSEC M. & BARLIC-MAGANJA D. (2007). Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: a novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR-ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. *J. Virol. Methods*, **146**, 341–354.

MCCOLLUM W.H. (1970). Vaccination for equine viral arteritis. Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1969, Karger, Basle, Switzerland, 143–151.

MCCOLLUM W.H., PRICKETT M.E. & BRYANS J.T. (1971). Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 459–464.

MISZCZAK F., SHUCK K.M., LU Z., GO Y.Y., ZHANG J., SELLS S., VABRET A., PRONOST S., FORTIER G., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. (2011). Evaluation of two magnetic-bead-based viral nucleic acid purification kits and three real-time reverse transcription-PCR reagent systems in two TaqMan assays for equine arteritis virus detection in semen. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3694–3696.

MOORE B.O. (1986). Development and evaluation of three equine vaccines. *Irish Vet. J.*, **40**, 105–107.

NEWTON J.R., GERAGHTY R.J., CASTILLO-OLIVARES J., CARDWELL M. & MUMFORD J.A. (2004). Evidence that use of an inactivated equine herpesvirus vaccine induces serum cytotoxicity affecting the equine arteritis virus neutralisation test. *Vaccine*, **22**, 4117–4123.

NUGENT J., SINCLAIR R., DEVRIES A.A.F., EBERHARDT R.Y., CASTILLO-OLIVARES J., DAVIS POYNTER N., ROTTIER P.J.M. & MUMFORD J.A. (2000).

Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (GL) of equine arteritis virus. *J. Virol. Methods*, **90**, 167–183.

SENNE D.A., PEARSON J.E. & CABREY E.A. (1985). Equine viral arteritis: A standard procedure for the virus neutralisation test and comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, **89**, 29–34.

TIMONEY P.J., BRUSER C.A., MCCOLLUM W.H., HOLYOAK G.R. & LITTLE T.V. (2004). Comparative sensitivity of LLC-MK2, RK-13, vero and equine dermis cell lines for primary isolation and propagation of equine arteritis virus. *In: Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection*, Timoney P.J., ed. M.H. Cluck Equine Research Center, 20–21 October 2004, Lexington, Kentucky, USA, pp 26–27.

TIMONEY P.J., MCCOLLUM W.H., MURPHY T.W., ROBERTS A.W., WILLARD J.G. & CARSWELL G.D. (1987). The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **35**, 95–102.

TIMONEY P.J. & MCCOLLUM W.H. (1993). Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, **9**, 295–309.

VAALA W.E., HAMIR A.N., DUBOVI E.J., TIMONEY P.J. & RUIZ B. (1992). Fatal congenitally acquired equine arteritis virus infection in a neonatal foal. *Equine Vet. J.*, **24**, 155–158.

WEBER H., BECKMANN K. & HAAS L. (2006). Fallbericht. Equines arteritisvirus (EAV) als aborterreger bei alpacas? *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, **113**, 162–163.

WESTCOTT D.G., KING D.P., DREW T.W., NOWOTNY N., KINDERMANN J., HANNANT D., BELAK S. & PATON D.J. (2003). Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet. Res.*, **34**, 165–176.

ZHANG J., SHUCK K.M., MCCOLLUM W.H. & TIMONEY P.J. (2004). Comparison of virus isolation in cell culture and RT-PCR assays for detection of equine arteritis virus in cryopreserved semen. *Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection*, Timoney P.J., ed. M.H. Gluck Equine Research Center, 20–21 October, 2004, Lexington, Kentucky, USA, 41–42.

ZHANG J., TIMONEY P.J., SHUCK K.M., SEOUL G., GO Y.Y., LU Z., POWELL D.G., MEADE B.J. & BALASURIYA U.B.R. (2010). Molecular epidemiology and genetic characterization of equine arteritis virus isolates associated with the 2006–2007 multi-state disease occurrence in the USA. *J. Gen. Virol.*, **91**, 2286–2301.

*
* *

ВНИМАНИЕ: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по диагностике инфекции вирусом артериита 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 инфекции вирусом артериита лошадей, просим Вас обращаться в Справочные лаборатории МЭБ.