

## РАЗДЕЛ 3.9

### ДРУГИЕ БОЛЕЗНИ<sup>1</sup>

#### ГЛАВА 3.9.1

### БУНЬЯВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ

(за исключением лихорадки долины Рифт и конго-крымской геморрагической лихорадки)\*

#### РЕЗЮМЕ

Семейство буньявирусов (Bunyaviridae) насчитывает свыше 300 вирусов, которые делятся на пять родов. Вирусы всех родов, за исключением хантавирусов, передаются позвоночным через членистоногих (арбовирусы). Родами, имеющими значимость для ветеринарии, являются найровирус (Nairovirus), ортобуньявирус (Orthobunyavirus) и флебовирус (Phlebovirus). Найровирус включает в себя зоонозный вирус конго-крымской геморрагической лихорадки (см. главу 2.1.5) и патогенный вирус жвачных животных, являющийся возбудителем болезни найробийских овец (БНО). Самый большой род, ортобуньявирусов, состоит из 48 серологических групп, включающих в себя только несколько значимых патогенных организмов животных, среди которых вирус долины Кэи (ВДК), вирус Акабане (ВАКА) и вирус Шмалленберга (ВШБ). Тропизм этих вирусов распространяется на ткани плода, вследствие чего эти вирусы становятся причиной пренатальной гибели плода и множественных врожденных дефектов. ВШБ, новый ортобуньявирус, появился в 2011 году в Европе. Этот вирус был обнаружен у ягнят и детенышей животных с врожденными дефектами (пороками развития) в различных европейских странах и распространился на большую часть Европы. Другими представителями семейства буньявирусов, имеющими значимость для ветеринарии, являются вирус лихорадки долины Рифт, представитель рода флебовирусов, описанный в главе 2.1.18 – Вирус лихорадки долины Рифт.

Представители родов найровирусов и ортобуньявирусов представляют собой оболочечные вирусы со сферической или плеоморфной молекулой ДНК, диаметр которых составляет 80-110 нм, и которые имеют три сегмента генома (S, M и L) отрицательной полярности.

#### **Идентификация возбудителя болезни:**

ВДК, представитель серологической группы вирусов Буньямвера (*Bunyavirus*) рода ортобуньявирусов, может быть выделен из крови лихорадящих или зараженных вирусом взрослых животных. Попытки выделения вируса из крови плода при рождении, как правило, не приносят успеха по причине элиминации вируса под воздействием иммунного ответа плода. Для выделения вируса используются клеточные линии, полученные из почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero) или из почки детеныша хомяка (ПДХ). В качестве альтернативного метода может использоваться также внутримозговая

---

<sup>1</sup> В настоящем разделе Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных болезни, отмеченные звездочкой (в содержании и в названии главы) включены в некоторые главы Перечня болезней МЭБ, посвященные отдельным видам, однако эти разделы охватывают несколько видов, и, таким образом, в них дается более широкое описание.

инокуляция детенышей мыши. Вирус или антиген определяются методами реакции иммунной флюоресценции (РИФ), иммуногистохимического исследования (ИГХ) или нейтрализации вируса (НВ). Для обнаружения ортобуньявирусов разработаны техники групповой и вирус-ориентированной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ВАКА может быть выделен из крови зараженных вирусом животных и, в отдельных случаях, из эмбрионального материала. Для этих целей используются клетки Vero, ПДХ и клеточные линии комара. Вирус или антиген идентифицируются методами РИФ, ИГХ или НВ. Для обнаружения вируса Акабана и родственных ему вирусов были разработаны техники гнездовой и мультиплексной в масштабе реального времени ПЦР с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ).

ВШБ может быть выделен из крови зараженных вирусом взрослых животных и, в отдельных случаях, из различных тканей инфицированного плода, в частности, из мозгового материала, с использованием различных клеточных линий: клеток насекомых (КН), ПДХ или клеток Vero. Тем не менее, процесс выделения вируса может протекать сложно, и для выращивания ВШБ в лабораторных условиях необходима адаптация к культуре клеток. Установленные процедуры ПЦР ОТ в масштабе реального времени и имеющиеся в продаже комплекты для ПЦР позволяют осуществлять процедуры высокочувствительного и специально ориентированного обнаружения вирусов в крови инфицированных жвачных животных, находящихся в острой стадии заражения, а также в крови, органах и другом материале инфицированного плода, таком как мозг, плацента, околоплодные воды и меконий. Несмотря на это, обнаружение генома ВШБ возможно только в инфицированном плоде и плоде с пороками развития, и эффективность такого обнаружения не является одинаковой для всех тканей по причине элиминации вируса в период беременности.

Вирус, являющийся возбудителем болезни найробийских овец (БНО), наиболее эффективно выделяется из плазмы крови лихорадящих животных, а также из брыжеечных лимфатических узлов и селезенки. Клеточная линия ПДХ и культуры клеток почки ягненка или хомяка являются самыми чувствительными клетками. Идентификация вируса может осуществляться методом РИФ на инокулированных культурах клеток тканей. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле также может использоваться для демонстрации наличия антигена БНО в тканях, однако при использовании этого метода будут наблюдаться перекрестные реакции с другими вирусами рода найровирусов. Зараженные культуры клеток тканей могут использоваться в качестве источников антигенов для реакции связывания комплемента и твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазный ИФА).

**Серологические реакции:** При обнаружении ВДК и ВАКА твердофазный ИФА и метод НВ используются для обнаружения соответствующих антител. Были опубликованы данные по конкурентной реакции твердофазного ИФА для обнаружения вируса Акабана; в продаже имеются соответствующие комплекты. При определении ВШБ используются метод твердофазного ИФА (в продаже имеются комплекты для непрямого и блокирующего твердофазного ИФА), непрямой метод флюоресцирующих антител (непрямой МФА) и методы НВ, служащие для обнаружения антител к ВШБ в образцах сыворотки. Наиболее подходящим методом для обнаружения БНО является непрямой МФА. Реакция связывания комплемента (СК) и реакции непрямого гемагглютинации также использовались для подтверждения вспышек БНО в полевых условиях. Реакции НВ дают сомнительные результаты, что характерно также и для других представителей группы найровирусов. Эффективность твердофазного ИФА для определения БНО в настоящее время оценивается. Зараженная селезенка может использоваться в качестве источника антигена в реакциях иммунодиффузии.

### **Требования к вакцинам и биологическим препаратам для диагностики:**

В настоящее время вакцины против ВДК не существует. Вакцины против ВАКА выпускались. Изучалась экспериментальная аттенуированная живая вирусная вакцина против БНО, а инактивированная культуральная вакцина продемонстрировала иммуногенные свойства. В 2013 году инактивированные вакцины против ВШБ получили временное регистрационное удостоверение в некоторых европейских странах, таких как Великобритания и Франция.

## **А. ВВЕДЕНИЕ**

Буньявирусы различаются по своей способности поражать людей, что показано в следующих описаниях каждого вируса. Оценка специфического риска, как описано в главе 1.1.4. *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*, должна проводиться для определения, как средств биологической безопасности, так и средств биологического сдерживания, необходимых для обеспечения надлежащего обращения с инфицированными материалами в лаборатории.

### **1. Вирус долины Кэш**

Вирус долины Кэш (ВДК) представляет собой тератогенный ортобуньявирус, распространенный в Северной Америке и поражающий, в основном, овец. В результате экспериментов с заражением вирусом плода овцы была подтверждена роль ВДК в возникновении пороков развития плода (Rodrigues Hoffman *et al.*, 2012). Недавнее обследование особей крупного рогатого скота показало, что 28% особей продемонстрировали положительный результат по специфическим антителам к ВДК (Sahu *et al.*, 2002). Данный вирус является представителем серологической группы Буньямвера рода ортобуньявирусов семейства буньявирусов (Fauquet *et al.*, 2005) и самым распространенным представителем ортобуньявирусов в Северной Америке (Calisher *et al.*, 1986). ВДК впервые был выделен из крови, накопленной в организме комара, в штате Юта (США) в 1956 году (Holden & Hess, 1959), однако его связь с болезнью была установлена в период резкого повышения пренатальной смертности и увеличения случаев пороков развития ягнят в стаде овец в Техасе в 1987 году (Crandell *et al.*, 1989). Также этот вирус выделялся из организма лошади и клинически здоровой коровы.

Серологические реакции показали широкую распространенность антител у домашних и диких жвачных животных и лошадей. Серопревалентность к ВДК является высокой у оленей, и виремия продолжительностью от 1 до 3 дней является достаточной для инфицирования переносчиков, позволяя оленям выступать в качестве амплифицирующих носителей вируса (Blackmore & Grimstad, 1998). Насекомые-переносчики включают в себя, как мокрецов рода *Culicoides*, так и комаров, принадлежащих к родам *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia* и *Culiseta*.

Заражение ВДК взрослых животных в большинстве случаев протекает бессимптомно, и зараженные в целях эксперимента овцы демонстрируют только переходную фебрильную реакцию, однако у них обнаруживается виремия. Сообщалось также о двух случаях заболевания людей (Campbell *et al.*, 2006; Sexton *et al.*, 1997).

ВДК являлся первым на территории Северной Америки *ортобуньявирусом*, связь которого с артрогрипозом и гидроанэнцефалией плода надлежало установить, однако в результате проведенных экспериментов было установлено, что другие родственные вирусы имеют такой же потенциал. Клинический исход заражения плода ВДК зависит от возраста. Пороки развития плода возникают в случае заражения в период между 27-м и 45-м днем беременности; заражение в период с 28-го по 36-й день является причиной развития дефектов центральной нервной системы (ЦНС) и дефектов опорно-двигательного аппарата, а заражение в период с 37-го по 42-й день приводит только к формированию дефектов опорно-двигательного аппарата. Заражение в период после 50 дней беременности не приводит к поражению плода, а после 76 дней беременности плод обладает полноценным иммунитетом, и в его организме вырабатываются антитела. Большинство случаев гибели плода в результате заражения ВДК приходится на период между 27-м и 35-м днем беременности. Тем не менее, плод является восприимчивым к воздействию вируса в любом возрасте, демонстрируя тропизм множества *ортобуньявирусов* к тканям плода (Chung *et al.*, 1990).

Макропатологии опорно-двигательного аппарата включают в себя артрогрипоз одной или более конечностей, искривление шеи, сколиоз позвоночника и мышечную гипоплазию. Поражения ЦНС включают в себя гидроанэнцефалию, гидроцефалию, порэнцефалию, микроэнцефалию, церебральную и мозжечковую гипоплазию и микромилию (Chung *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1997). Также были зафиксированы случаи обнаружения мертвых эмбрионов и мертворожденных или мумифицированных ягнят с отсутствием каких-либо видимых дефектов. Также наблюдаются случаи развития анасарки (распространенного отека подкожной клетчатки) и маловодия. Считается, что такое снижение количества околоплодных вод служит причиной ограничения движений плода и, таким образом, приводит к развитию деформаций скелета. Случаи дефектов развития конечностей связаны с нейродегенеративными изменениями, выявляемыми гистопатологически и представляющими собой участки некротического поражения и потерю паравентрикулярных нейтрофилов в головном мозгу вместе с сокращением количества двигательных нейронов. Изменения в скелетной мускулатуре связаны с плохой выработкой миотубулярных миоцитов (Edwards *et al.*, 1997).

## 2. Вирус Акабане

Вирус Акабане (ВАКА) представляет собой тератогенный *ортобуньявирус*, широко распространенный во всем мире, но не встречающийся на американских континентах. Этот вирус поражает, в основном, крупный рогатый скот. Вирус является представителем серологической группы Simbu<sup>2</sup> рода *ортобуньявирусов* семейства *буньявирусов* (Karabatsos, 1985). Другими потенциально патогенными вирусами серологической группы Simbu являются айнский вирус (Aino), вирус Питон (Peaton), вирус Шмалленберга, вирус Шамонда (Shamonda) и вирус Тинару (Tinaroo). ВАКА является одной из основных причин развития артрогрипоза и гидроанэнцефалии. В результате экспериментов с заражением новорожденных телят и беременных овец было установлено, что айнский вирус и вирус Питон (Peaton) могут являться причиной возникновения пороков развития у жвачных животных (Parsonson *et al.*, 1982; Tsuda *et al.*, 2004), однако связь вируса Питон (Peaton) с развитием болезни никогда не устанавливалась в полевых условиях. Айнский вирус являлся причиной резкого роста числа врожденных аномалий у жвачных животных в Японии и один раз в Австралии.

---

<sup>2</sup> В рамках существующей классификации, принятой Международным комитетом по таксономии вирусов, термин «серологическая группа» в отношении буньявирусов не признается. В настоящей главе данный термин используется в качестве условного термина.

Впервые ВАКА был выделен в 1959 году: сначала из крови, накопленной в организме комара, а затем из крови, накопленной в организме мокрецов рода *Culicoides*. Затем в 1972 году вирус был выделен из крови, накопленной в организме мокрецов рода *Culicoides*, в Австралии, и из крови, накопленной в организме комара, в Африке. Антитела к ВАКА были обнаружены в сыворотке крови крупного рогатого скота, овец, козлов, лошадей, буйволов и верблюдов. В организме множества местных видов животных на юге Африки, в пустыне Сахара, имеются антитела, нейтрализующие ВАКА. ВАКА распространен на Ближнем Востоке, в Азии, на Кипре, в Африке и Австралии. Вспышки болезни Акабане время от времени возникают в таких странах, как Австралия и Израиль, где не проводится регулярная вакцинация. Обычно вспышки возникают при наличии условий, благоприятных для переносчиков, и распространяются за пределы эндемического ареала, проникая в популяции восприимчивых животных, находящихся на ранних и средних сроках беременности, или в случаях отсутствия вируса в эндемическом ареале на протяжении одного или более лет, как правило, в результате засухи.

Заражение ВАКА взрослых животных обычно протекает бессимптомно, однако в Японии была установлена связь между ВАКА и энцефаломиелитом у взрослых особей крупного рогатого скота (Lee *et al.*, 2002; Miyazato *et al.*, 1989). Серологическая специфичность у особей крупного рогатого скота изменяется после 3–4 дня течения вирусемии.

В эндемических областях самки заражаются до достижения половозрелого возраста, и выработка антител в организме самок способствует предотвращению заражения плода. Обычно болезнь можно наблюдать у плода самок, ранее не получавших лечение, после заражения в период с 30-го по 70-й день беременности (овцы) и в период с 70-го по 150-й день беременности (коровы). На более поздних сроках беременности врожденные дефекты (пороки развития) проявляются в легкой форме и в редких случаях, хотя заражение плода коровы определенными штаммами ВАКА в период, близкий к указанному, может привести к рождению телят с энцефалитом. ВАКА предрасположен к поражению клеток головного мозга, спинного мозга и скелетных мышц, при котором невоспалительный некроз препятствует морфогенезу.

Случаи заражения ВАКА изучались в ряде экспериментов с заражением данным вирусом овец и козлов, проводившихся с целью исследования процессов возникновения и развития артрогрипоза / гидроэнцефалии, кифоза, сколиоза, микроэнцефалии и порэнцефалии, а также случаев мертворождения и выкидышей (Parsonson *et al.*, 1975). Инфицирование плода овец и коров в условиях естественной среды обитания животных было описано в период роста перинатальной смертности ягнят, и наиболее часто наблюдавшимся дефектом развития, установленном в процессе данного исследования, была врожденная микроэнцефалия.

Результаты экспериментов по исследованию ВАКА, проводившиеся на беременных особях крупного рогатого скота, показали, что тип дефекта зависит от внутриутробного возраста плода: гидроанэнцефалия наблюдалась в период с 76-го по 104-й день беременности, а артрогрипоз – в период с 103-го по 174-й день беременности (Kirkland *et al.*, 1988). Разница во времени появления различных пороков и дефектов развития плода отчетливо видна у плода коров, в то время как у плода овец, период беременности которых является более коротким, пороки развития мозга и скелета проявляются одновременно. Последовательность событий в период резкого роста случаев гибели плода, вызванной ВАКА, начинается с рождения телят с нарушенной координацией движений, за которым следуют случаи развития артрогрипоза, диспластических изменений мышц и, наконец, случаи развития гидроанэнцефалии и других тяжелых поражений ЦНС. Этим событиям могут предшествовать случаи мертворождения и выкидышей (Shepherd *et al.*, 1978). ВАКА

является причиной развития тяжелых расстройств и поражений нервной системы и мышц, характеризующихся безгнойным энцефаломиелитом, очаговой церебральной дегенеративной энцефаломиелопатией, порэнцефалией, микроэнцефалией, гидроанэнцефалией, потерей двигательных нейронов и аксонов передними рогами серого вещества спинного мозга, истощением запасов миелина в двигательных пучках (трактах) спинного мозга, развитием некроза и полимиозита (болезни Вагнера) в мышечных трубочках с паренхимальной дегенерацией скелетных мышц. Дефекты и пороки развития позвоночника включают в себя сколиоз и кифоз, а артрогрипоз может поражать почти любые сочленения костей и мышц скелета.

### 3. Вирус Шмалленберга

ВШБ впервые был обнаружен в ноябре 2011 года в Германии в образцах, собранных в октябре 2011 года у особой молочного скота с симптомами лихорадки и сниженным удоем. Схожие клинические проявления (включая диарею) наблюдались у дойных коров в Нидерландах, где наличие ВШБ также было подтверждено в декабре 2011 года. С начала декабря 2011 года врожденные дефекты отмечались у новорожденных ягнят в Нидерландах, и ВШБ был обнаружен и выделен из ткани головного мозга. С тех пор ВШБ обнаруживался во многих европейских странах, а также в Казахстане. Сообщения о подозрениях на заражение вирусом в прошлом отмечались в Турции и Южной Африке.

ВШБ представляет собой оболочечный вирус с отрицательно-полярной сегментированной однонитевой РНК. Вирус принадлежит к семейству буньявирусов, роду ортобуньявирусов и является представителем вирусов серологической группы Simbu, включающей в себя вирусы Сатупери (Sathuperi), Акабане (Akabane) и айнский вирус (Aino) (Hoffman *et al.*, 2011). Последние филогенетические исследования различных вирусов, принадлежащих к серологической группе Simbu, позволили предположить, что ВШБ не является реассортантом и имеет наиболее тесную связь с вирусами вида Сатупери. Самым близкородственным ВШБ среди данного вида является австралийский вирус Дуглас (Goller *et al.*, 2012). Следует отметить, что вирусы, относящиеся к серологической группе Simbu, никогда не выделялись в Европе до 2011 года.

Как и другие генетически родственные вирусы, принадлежащие к серологической группе Simbu, ВШБ поражает жвачных животных. Заражение этим вирусом крупного рогатого скота, овец, козлов, косуль и бизонов подтверждалось, как полимеразной цепной реакцией в масштабе реального времени с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ), так и выделением вируса (Bilk *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2011). Антитела к данному вирусу были обнаружены у благородных оленей, альпак и диких баранов (муфлонов).

Результаты экспериментов с заражением вирусом крупного рогатого скота и овец показали отсутствие клинических проявлений или слабые клинические проявления на 3–5-й день после инокуляции при длительности инкубационного периода 2–4 дня и длительности виремии 2–5 дней (Hoffmann *et al.*, 2011, Wernike *et al.*, 2013).

Вирус передается насекомыми-переносчиками, а затем вертикальным путем в утробе. Геном ВШБ был обнаружен у нескольких насекомых вида Culicoides. В дельнейшем необходимо получить информацию о том, какие виды насекомых ответственны за передачу вируса, и играют ли какую-либо роль в этой передаче комары. Факт вертикальной передачи вируса через плаценту подтвержден, однако прямая передача вируса от животного к животному является маловероятной. Эксперимент по заражению оральным путем не увенчался успехом, и контактирующие животные не были заражены

(Wernike *et al.*, 2013). Кроме того, повторное инфицирование ранее инфицированных телят оказалось невозможным (Wernike *et al.*, 2013).

Клинические проявления различаются по видам: у взрослых коров наблюдалась легкая форма острого заболевания в течение сезона активности насекомых-переносчиков; развитие врожденных дефектов чаще наблюдалось у представителей различных видов жвачных животных (к настоящему времени: у крупного рогатого скота, овец, козлов и бизонов). Некоторые фермы по разведению молочных овец и коров также сообщали о случаях диареи у животных (Beer *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2012; van der Brom *et al.*, 2012; Wernike *et al.*, 2013).

Клинические проявления заражения вирусом можно обобщить термином «синдром артрогрипоза и гидроанэнцефалии» (АГ/ГАЭ): у животных с пороками развития и мертворожденных животных (телят, ягнят, детенышей) патологическими симптомами были артрогрипоз-гидроанэнцефалия, брахигнатия (недоразвитие нижней челюсти), анкилоз, искривление шеи и сколиоз. Точное число возможных дефектов и пороков развития неизвестно и варьируется в зависимости от срока беременности на момент заражения. В нескольких европейских странах продолжаются эпидемиологические, иммунологические и вирусологические исследования.

В процессе серологических исследований людей не обнаружено каких-либо свидетельств, подтверждающих, что данное заболевание является зоонозом (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012; Reusken *et al.*, 2012).

#### **4. Вирус-возбудитель болезни найробианских овец**

Болезнь найробианских овец (БНО) – это болезнь овец и козлов, возбудителем которой является найровирус, принадлежащий к семейству буньявирусов (Davies, 1988). Болезнь характеризуется смертностью, варьирующейся от 40 % до 90 %; наличие этой болезни у животных всегда следует предполагать в том случае, когда животные были недавно перемещены из области, в которой данная болезнь не распространена, в область, где она является эндемической. Вспышки болезни также следуют за вторжением клещей в области, в которых они ранее отсутствовали, в частности, после проливных дождей (Davies, 1997). Клинические проявления болезни у овец и козлов являются схожими, хотя существуют некоторые различия в восприимчивости среди различных пород и видов, а также в их реакции на заражение вирусом БНО – некоторые животные являются более восприимчивыми, чем другие. Крупный рогатый скот и дикие животные не подвержены заражению вирусом БНО (Zeller & Bouloy, 2000). Длительность инкубационного периода болезни варьируется от 2 до 5 дней, в течение которых температура тела составляет 41–42°C. В случае развития болезни наблюдается учащенное поверхностное дыхание, сопровождающееся тяжелым депрессивным состоянием, анорексией и нежеланием двигаться. Животные стоят с опущенной головой, у них наблюдаются симптомы конъюнктивита и серо-кровянистые выделения из носа. Некоторые из поверхностных лимфатических узлов, такие как прескапулярные (предлопаточные) и/или узлы коленных складок, становятся пальпируемыми. Диарея, как правило, развивается в течение 36–56 часов с момента возникновения фебрильной реакции. На первом этапе диареи наблюдается обильный водянистый и зловонный кал, затем – кал с кровянистыми выделениями и слизью, сопровождающийся коликами и тенезмами. Выкидыш является обычным последствием заражения. Для обнаружения иксодовых клещей *Rhipicephalus appendiculatus* желательно проводить осмотр тех мест, на которые чаще всего прикрепляются клещи, например, осмотр ушей, головы и тела.

Летальный исход возможен в острейших случаях болезни в течение 12 часов с момента возникновения симптомов лихорадки и в любое время в течение фебрильной реакции, если животное находится в острой стадии болезни. Последующие случаи смерти животных могут наблюдаться в течение 3–7 дней после падения температуры и связаны с тяжелой диареей и обезвоживанием организма.

Макропатология в случае возникновения БНО может быть ложной; при этом, большинство случаев летального исхода приходится на период виремии, когда единственными проявлениями являются, как правило, лимфаденит с петехиальными и экхимотическими кровоизлияниями на серозных поверхностях пищеварительного тракта, селезенки, сердца и других органов. Ни один из этих симптомов не позволяет точно диагностировать БНО или даже заподозрить наличие этой болезни, поскольку данные симптомы характерны и для множества других лихорадочных заболеваний овец в областях, где БНО является эндемической болезнью. Болезни, которые могут быть ошибочно приняты за БНО, включают в себя лихорадку долины Рифт, чуму мелких жвачных животных, чуму крупного рогатого скота, сальмонеллез и инфекционный гидроперикардит. Позже, с развитием болезни, более отчетливо проявляется геморрагический гастроэнтерит с кровоизлияниями на слизистой оболочке сычуга, в частности, вдоль складок, в районе илеоцекального клапана, и, чаще всего, в ободочной и прямой кишке. Формирования «полосок зебры» на последней наблюдается довольно часто. Желчный пузырь, как правило, увеличен в размере и кровоточив. В случае выкидыша в половых путях самок могут возникать воспалительные поражения с кровоизлияниями. Несмотря на это, среди причин смерти множества животных, больных БНО, может не быть ни одного из указанных поражений желудочно-кишечного тракта, и предположительный диагноз в редких случаях ставится на основании обследования животного после его смерти. Среди гистопатологических поражений общего характера выделяются дегенерация миокарда, нефрит и некроз желчного пузыря.

Устанавливаемыми после смерти животного признаками, развивающимися по истечении ранней стадии БНО, являются неспецифические изменения, связанные с возникновением конгестии, а также петехиальные и экхимотические кровоизлияния на серозных поверхностях, на лимфатических узлах, на селезенке и других органах, таких как почки, легкие и печень. После смерти на более поздних этапах развития болезни очевидными становятся признаки геморрагического гастроэнтерита с образованием язв в сычуге, двенадцатиперстной кишке, слепой кишке и толстой кишке. Вирус передается, главным образом, клещами *Rhipicephalus appendiculatus*, и любое заражение этими паразитами должно являться причиной возникновения подозрений в наличии болезни. Вирус-возбудитель БНО также может передаваться другими видами рода *Rhipicephalus* и клещами *Amblyomma variegatum*.

Очевидно, что вирус БНО является довольно редким зоонозным вирусом, существующим в естественной среде и вызывающим у человека легкое гриппоподобное заболевание. Заражение данным вирусом в лаборатории может вызывать лихорадку и боли в суставах (Zeller & Bouloy, 2000).

## **В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

### **В1. Идентификация возбудителя болезни**

#### **1. Вирус долины Кэш**

При рождении ВДК не может быть выделен из организма новорожденного животного, однако этот вирус выделялся из крови, накопленной в организме комара, а также из крови взрослых животных, зараженных вирусом. Выделение вируса осуществлялось на культуре клеток тканей с использованием клеточных линий, таких как клетки почки детеныша хомяка (ПДХ), клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero) и клетки почки взрослой макаки-резус (LLC-MK2). Вирус может быть выделен в организме лихорадящего животного с использованием 10 % лейкоцитарной пленки в минимальной питательной среде (МПС) и путем совместного выращивания с клетками Vero в МПС, дополненной 2 % сывороткой крови эмбриона коровы.

Также выделение вируса часто осуществляется в организме новорожденных или отлученных детенышей мыши путем внутримозговой и внутрибрюшинной инокуляции.

Многие представители *ортобуньявирусов* были секвенированы, поскольку они являются опасными с медицинской точки зрения патогенами, связанными с развитием энцефалита у людей, как в Северной, так и в Южной Америке. Технология полимеразной цепной реакции (ПЦР) применялась в исследованиях крови, накопленной в организме комара, вместо традиционного выделения вируса в организме детенышей мыши, в результате чего восприимчивость составила одного положительного комара из 100 особей, что невозможно определить с помощью традиционного метода титрования на планшете в культуре клеток (Huang *et al.*, 2001).

Разработаны группа-специфические и вирус-специфические праймеры, и, с использованием метода ПЦР ОТ вирусы, принадлежащие к серологическим группам Буньявера (BUN) и Калифорния (CAL), могут быть дифференцированы. Используя метод гнездовой ПЦР ОТ, вирусы серологической группы CAL и большинство из вирусов серологической группы BUN могут быть дифференцированы с представителями рода *ортобуньявирусов* (Kuno *et al.*, 1996; Moreli *et al.*, 2001). Сообщалось о недавнем исследовании с применением двойной ПЦР ОТ в масштабе реального времени для обнаружения вирусов серологической группы CAL и ВДК (Wang *et al.*, 2009), хотя данный метод еще не проверялся на предмет возможности его применения в ветеринарии.

## 2. Вирус Акабане

Заражение данным вирусом редко диагностируется на основании выделения вируса, и, как правило, устанавливается методами серологического и иногда гистопатологического исследования. Тем не менее, данный вирус выделялся в организме зараженных индикаторных животных с использованием плазмы крови или лейкоцитарных пленок, полученных в группах переносчиков и, в редких случаях, из материала плода. Метод ПЦР ОТ описан в разделе, посвященном обнаружению ВАКА. Использование данного метода может помочь диагностировать заражение, однако разнообразие представителей рода *ортобуньявирусов* требует проведения валидации метода с целью подтверждения возможности его специфического использования, поскольку существуют сведения, свидетельствующие о генетической рекомбинации.

Выделение вируса в культуре клеток ткани часто осуществляется с использованием клеток Vero и клеточных линий ВНК-21 и HmLu-1. В случае использования клеток комара С6/36 или клеток насекомых (КН) вида *Culicoides* клеточные культуры оставляются на 7 дней в неподвижном состоянии, после чего материал переносится на ПДХ или линию клеток Vero, где цитопатические изменения в культурах становятся заметными.

Методы, применявшиеся для идентификации ВАКА с использованием моноспецифических антител, включали в себя нейтрализацию вируса (НВ) и иммунофлюоресценцию (ИФ) (Blacksell *et al.*, 1997; Gard *et al.*, 1988). Обнаружение антигена в материале, зафиксированном в формалине, осуществлялось путем окрашивания на пероксидазу эмбрионального материала (материала плода) коров и овец, а также в организме инфицированных естественным путем новорожденных телят (Noda *et al.*, 2001). Методы обнаружения нуклеиновой кислоты также разрабатывались с целью дифференциации айнского вируса и вируса Акабана с использованием метода гнездовой ПЦР ОТ, после которой осуществлялось рестрикционное картирование генома с целью дифференциации вируса Акабана, айнского вируса, вируса Питон (Peaton) и вируса Тинару (Tinao), принадлежащих к серологической группе Simbu (Akashi *et al.*, 1999). Мультиплексная в масштабе реального времени ПЦР ОТ также описана как метод с использованием датчиков обнаружения полимеразы Taq Man, т.е. как метод, позволяющий надежно и точно идентифицировать вирус Акабана и айнский вирус (Stram *et al.*, 2004). Альтернативой методу ПЦР ОТ в обнаружении ВАКА является изотермическая амплификация с формированием петель с обратной транскрипцией, позволяющая обнаружить как минимум пять TCID<sub>50</sub> (полуинфицирующих доз культуры ткани) вируса на 1 мл (Qiao *et al.*, 2013).

### 3. Вирус Шмалленберга

ВШБ может быть обнаружен методом ПЦР ОТ в масштабе реального времени (Bilk *et al.*, 2012). В продаже имеются комплекты для ПЦР. Патогенный вирус может быть выделен в культуре клеток. Для выделения вируса использовались клетки насекомых (КН), клетки почки детеныша хомяка (ПДХ) и клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero). Образцы, используемые для обнаружения или выделения вируса, должны транспортироваться в охлажденном или замороженном состоянии. Сыворотка крови или кровь с ЭДТК (этилендиаминтетрауксусной кислотой) являются стандартными источниками материала для обнаружения острой инфекции у живых животных в течение короткого периода виремии (2–6 дней). В случае с мертворожденными и имеющими дефекты и пороки развития телятами, ягнятами и детенышами других животных РНК вируса может быть обнаружена в образцах тканей головного мозга (полушарий и стволовой области) и околоплодной жидкости (околоплодных водах), а также в околоплодных водах и плаценте или меконии живых новорожденных детенышей. Несмотря на это, процедура выделения вируса является сложной, и результаты проведенных испытаний были лишь частично успешными.

В случае с мертворожденными и имеющими дефекты и пороки развития телятами, ягнятами и детенышами других животных диагностика может осуществляться также методом гистопатологического исследования находящейся в фиксированном состоянии центральной нервной системы, включая спинной мозг. Различные поражения могут являться признаками гидроанэнцефалии, гипоплазии центральной нервной системы, порэнцефалии и подкожного отека (у телят). Тем не менее, чувствительность данного метода является более низкой по сравнению с чувствительностью методов ПЦР ОТ.

Если симптомы не являются специфическими, необходимо выполнить дифференциальную диагностику. В случае наличия острой инфекции у взрослых животных необходимо учесть все возможные причины высокой температуры (лихорадочного состояния), диареи и снижения удоя. В случае с дефектами и пороками развития у телят, ягнят и детенышей других животных необходимо учесть возможность воздействия других ортобуньявирусов, вируса синего языка овец, пестивирусов, а также генетических факторов и токсических веществ.

#### 4. Вирус-возбудитель болезни найробианских овец

Вирус-возбудитель БНО может быть выделен из материала, собранного в полевых условиях с использованием лабораторных животных или культур клеток (Davies *et al.*, 1977a). Во время работы с возбудителем этой болезни необходимо соблюдать соответствующие меры предосторожности для защиты от инфекций, передающихся воздушно-капельным путем. Некоагулированная кровь, а также ткань брыжеечных лимфатических узлов и селезенки, предоставляемые вместе с замороженными гелевыми пакетами, являются оптимальными образцами, подлежащими сбору у лихорадящих или мертвых животных. Плазма крови может быть использована непосредственно в качестве инокулята, а ткань лимфатических узлов или селезенки должна быть гомогенизирована для создания приблизительно 10% (процентное соотношение веса и объема) суспензии в транспортной среде. В качестве транспортной среды может использоваться среда Хенкса, содержащая 0,5% гидролизата лактальбумина или 0,75% альбумина сыворотки крупного рогатого скота (альбумина бычьей сыворотки), а также содержащая пенициллин (500 международных единиц/мл), сульфат стрептомицина (500 мкг/мл) и микостатин (50 единиц/мл) или фунгизон (2,5 мкг/мл).

Особую ценность для выделения вируса в культуре клеток представляет клеточная линия ВНК-21-С13; также используются линия клеток Vero (Shepherd *et al.*, 1978) и первичные и вторичные клетки почки ягненка или хомяка. Большинство штаммов вируса БНО производит цитопатическое действие (ЦПД) на первый пассаж в клетках ПДХ; другие штаммы производят более явное ЦПД только после перевивания линии клеток. ЦПД, производимое на клетки тестикул или почек ягненка является ненадежным, но может иметь место после многократного пассажа. Культуры в трубочках следует использовать, как в случае применения покровных стекол, так и в случае без их применения, или в случаях, когда с целью выделения вируса используются пластиковые бутылки; культуры на предметном стекле (планшете) с микролунками также должны быть приготовлены. Следует инокулировать приблизительно 0,2 мл, и для абсорбции необходимо обеспечить период продолжительностью 1–2 часа. ЦПД становится очевидным в культурах, выращиваемых в роллерных флаконах, проявляясь в виде скоплений гранулярных закругленных клеток по истечении 24–48 часов в клетках ПДХ, и в течение последующих 24–48 часов в других типах клеток. ЦПД не является специфическим для вируса БНО, который идентифицирован в культурах с применением покровных стекол путем ИФ или путем окрашивания гематоксилином и эозином. Последний метод позволяет обнаруживать плеоморфные эозинофильные внутрицитоплазматические включения, в особенности, имеющие форму веретена; другие включения являются биполярными или окружают ядро.

Вирус может быть специально идентифицирован путем ИФ-окрашивания, которое может быть позитивным уже спустя 24–48 часов после инокуляции, когда ЦПД еще не стало очевидным. Конъюгаты для прямой иммунофлюоресценции могут быть приготовлены из гипериммунных асцитических жидкостей мышей и из иммунной сыворотки (антисыворотки) кроликов или овец традиционными методами. Перекрестная флюоресценция может возникать с другими найровирусами при использовании слабо разбавленных растворов конъюгата, однако эти вирусы обычно не связаны с развитием болезни у овец и козлов.

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (ИДАГ) может выступать в качестве ценного инструмента первоначальной диагностики, использующегося для обнаружения антигена к БНО. Данное испытание может проводиться в лабораториях без специальных средств для выращивания тканевых культур, а также в лабораториях для полевых исследований. Ткани

селезенки и брыжеечных лимфатических узлов используются в данном испытании на выбор. Аликвоты, составляющие от 0,5 до 1 грамма, должны быть гомогенизированы стерильным песком в пестике или гомогенизаторе для обеспечения 10–20% суспензий в фосфатно-буферном солевом растворе (ФБСР) или в солевом растворе. Суспензия должна центрифугироваться в течение 10–15 минут при приблизительной массе 1000 г; в данном испытании должна использоваться надосадочная жидкость. Это испытание может использоваться также для идентификации антигена к вирусу БНО в ткани головного мозга инфицированных в целях эксперимента мышей (см. выше).

Полученная из крови кролика гиперимунная сыворотка против БНО, предназначенная для использования в испытании методом ИДАГ, может быть приготовлена путем повторной инокуляции ткани головного мозга мыши, зараженной вирусом БНО. 2–5% (процентное соотношение веса и объема) суспензия из ткани головного мозга мыши готовится вышеописанным способом и центрифугируется при массе 3000–5000 г в течение 15 минут. После этого алиquotы смешиваются с равным объемом адьюванта. В данном случае могут использоваться различные режимы инокуляции, но 1-мл объемы могут вводиться подкожно и/или внутримышечно через 7-дневные интервалы на протяжении 3–5 недель, или, при наличии множества мест инокуляции, в течение равного периода могут вводиться 0,1-мл объемы. Сыворотка должна собираться через 5–7 дней после последней инъекции и храниться в алиquotе при температуре –20°C.

При проведении испытаний методом реакции связывания комплемента (СК) с целью идентификации вируса в качестве антигенов могут использоваться жидкости инфицированной культуры клеток тканей.

Антиген для твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА), используемый в целях идентификации вируса, может быть приготовлен из инфицированной культуры клеток тканей во флаконе. Клетки удаляются при помощи пипетки с резиновой грушей в том случае, когда примерно 20% монослоя клеточной культуры демонстрирует ЦПД. Клетки осаждаются и трижды промываются в боратно-солевом буферном растворе (рН 9). Затем клетки подвергаются лизису и разбавляются 1% ДСН (додецилсульфата натрия) и 1% полиоксиэтилированного неионогенного детергента Triton X100, разбавленных приблизительно на 1/5 боратно-солевым буферным раствором, и разрушаются ультразвуком с целью получения антигена для испытания методом твердофазного ИФА. Негативный контрольный антиген готовится аналогичным образом из неинфицированных клеток. Указанные антигены адсорбируются непосредственно на планшеты для проведения испытания методом твердофазного ИФА, после чего проводится испытание с иммунной сывороткой против вируса БНО и нормальной сывороткой с использованием обоих антигенов.

Имеется также описание БНО-специфической в масштабе реального времени ПЦР ОТ, согласно которому данный метод является более чувствительным, чем метод выделения вируса (Bin Tarif *et al.*, 2012). Несмотря на это, метод еще не прошел полную валидацию для использования в диагностических целях.

## **В2. Серологические реакции**

Данные исследования включают в себя тест на замедление гемагглютинации (ЗГ), а также испытания методами реакции СК, методом НВ и твердофазного ИФА, однако тест на ЗГ и испытание методом реакции СК используются редко.

### **1. Вирус долины Кэш**

## 1.1. Испытание методом нейтрализации вируса

Испытания методом нейтрализации вируса для идентификации ВДК проводятся путем нейтрализации процесса снижения бляшкообразования, однако в настоящее время они обычно выполняются с использованием процедуры замедления ЦПД на клетки Vero на микротитрационных планшетах (Chung *et al.*, 1990).

### 1.1.1. Методика

i) Инактивируйте тест-сыворотку путем выдерживания ее при температуре 56°C в течение 30 минут на водяной бане.

ii) Выполните последовательное двукратное разведение сыворотки в минимальной питательной среде в пропорции от 1/2 до 1/16 и осуществляйте инкубацию при температуре 37°C в течение 60 минут при равном объеме полуинфицирующей дозы культуры ткани (100 TCID<sub>50</sub>) на один мл объема вируса. Стандартные контрольные сыворотки готовятся аналогичным образом.

iii) Перенесите среду на 96-луночный плоскодонный микротитрационный планшет для клеточных культур, содержащий предварительно формировавшийся в течение 24 часов монослой клеток Vero.

iv) Добавьте на планшет микстуры из сыворотки /вируса, по 50 мкл на лунку, используя три лунки для разведения.

v) Выполните обратное титрование вируса, использовавшегося в испытании, осуществляя три десятикратных разведения с использованием 50 мкл на лунку и используйте четыре лунки для разведения.

vi) Накройте планшет и осуществляйте инкубацию еще в течение 60 минут при температуре 37°C.

vii) Добавьте по 50 мкл МПС в каждую лунку.

viii) Осуществляйте инкубацию препаратов при температуре 37°C в течение 6 дней во влажной камере в присутствии CO<sub>2</sub>.

ix) Рассмотрите препараты на планшете под микроскопом, оцените ЦПД и на 50% определите конечные результаты.

x) В процессе контроля вируса величина полуинфицирующей дозы культуры ткани должна составлять 100 (100 TCID<sub>50</sub>); процессы нейтрализации негативной (не содержащей антител) контрольной сыворотки при самом низком испытанном значении разведения не должны проходить. Величина титра при позитивном контроле должна находиться в ожидаемых пределах предварительно определенного среднего значения титра.

## 1.2. Твердофазный иммуноферментный анализ

Твердофазный ИФА, модифицированный и основанный на анализе лихорадки долины Рифт (Meegan *et al.*, 1987), использовался для серологических исследований ВДК. Модификации метода включают в себя разведение в пропорции 1/400 асцитической

жидкости мыши для нанесения на предметные стекла, а также разведение в пропорции 1/25 сахарозного/ацетонного экстракта антигена, полученного из головного мозга мыши, в многослойном формате твердофазного ИФА. В качестве жидкости для разведения используется фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 0,5% раствором Твин (Tween), 20,5% раствором сыворотки крови лошади и 500 мкг сульфата декстрана на мл. В данном методе также используются система обнаружения конъюгата пероксидазы хрена и субстрат АБТС (2,2'-азинобис-[3-этилбензтиазолин]-6-сульфониевая кислота) (Meegan *et al.*, 1987).

### **1.3. Прочие реакции**

Не все представители группы Буньямвера производят гемагглютинины, но реакция на ЗГ был описан для обнаружения ВДК с использованием сахарозного/ацетонного экстракта антигена, полученного из ткани головного мозга мыши-сосунка, и эритроцитов крови гуся при рН = 6,2. Данное исследование является менее чувствительным в сравнении с испытанием методом НВ, обеспечивая только 50% обнаружение антител. Испытание методом реакции СК используется нечасто по причине обширной перекрестной реактивности внутри группы Буньямвера.

## **2. Вирус Акабане**

### **2.1. Реакция на замедление гемагглютинации**

Реакция на ЗГ модифицирована Кларком и Касалсом (1958), в результате чего достигнута более высокая гемагглютинация при повышенной молярности NaCl. Данная реакция также зависит от значения рН. Сыворотки предварительно обрабатываются каолином или ацетоном и инактивируются путем нагревания при температуре 56°C в течение 30 минут. Данная реакция выполняется с использованием четырех единиц сахарозного/ацетонового экстракта антигена, полученного из ткани головного мозга мыши, 0,3% эритроцитов и боратного буфера (рН = 9) (Goto *et al.*, 1978).

### **2.2. Реакция нейтрализации вируса**

В описанной реакции методом НВ использовались клетки HmLu-1, клетки Vero или клетки ПДХ, помещенные на плоскодонный 96-луночный микротитрационный планшет (Cybinski *et al.*, 1976; Da Costa Mendes, 1984). В двух описанных методах период инкубации сыворотки/вируса составляет 1 час, или инкубация осуществляется в течение ночи перед добавлением клеток.

#### **2.2.1. Методика**

- i) Инактивируйте тест-сыворотку путем выдерживания ее при температуре 56°C в течение 30 минут на водяной бане.
- ii) Выполните последовательное двукратное разведение сыворотки в среде Игла в пропорции от 1/2 до 1/16 на 96-луночном плоскодонном микротитрационном планшете, используя дублирующие лунки и внося по 25 мл сыворотки в каждую лунку. Стандартные контрольные сыворотки готовятся аналогичным образом.
- iii) Добавьте по 25 мкл вируса, разведенного в среде Игла, для обеспечения значения 200 для полуинфицирующей дозы культуры ткани (200 TCID<sub>50</sub>) на 50 мкл.

iv) Накройте препараты и осуществляйте инкубацию при комнатной температуре в течение 1 часа.

v) Выполните обратное титрование вируса, использовавшегося в испытании, осуществляя три десятикратных разведения с использованием 25 мкл на лунку.

vi) Добавьте в каждую лунку по 100 мкл суспензии клеток в среде Игла, содержащей 2% сыворотки при объеме  $5 \times 10^5$  клеток/мл.

vii) Осуществляйте инкубацию препаратов при температуре 34–37°C в течение 5 дней во влажной камере в присутствии CO<sub>2</sub>.

viii) Рассмотрите препараты на планшете под микроскопом и вычислите титр, приняв его за обратную величину самого высокого значения разведения сыворотки, полностью замедлив ЦПД.

ix) Результаты контроля вируса и сыворотки должны быть ожидаемыми.

При инкубации в течение ночи двойные растворы сыворотки двукратного разведения смешиваются со 100 полуинфицирующими дозами заражения культуры ткани (100 TCID<sub>50</sub>) вирусом с использованием в каждом случае 100-мкл объемов. По завершении инкубации при температуре 37°C спустя 1 час и инкубации на протяжении ночи при температуре 4°C к материалу для испытания добавляется 50 мкл суспензии клеток. Препарат на планшете изучается на 3-й и 5-й день инкубации при температуре 37°C и проверяется на предмет наличия ЦПД.

### 2.3. Твердофазный иммуноферментный анализ

Имеется описание твердофазного ИФА ВАКА с использованием иммуноглобулина класса G (Иг G) и иммуноглобулина класса M (Иг M). Объем покрывающего антигена составляет 10<sup>6</sup> полуинфицирующих доз культуры ткани (10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>) на мл вируса, выращенного на клетках HmLu-1, разбавленных 0,05 M карбонатного/бикарбонатного буфера (pH = 9,6). В качестве среды для отмывки клеток используется ФСБ, содержащий раствор Твин 20 (Tween 20) и щелочную фосфатазу. В данном испытании используются также конъюгированные антитела кролика к Иг G и Иг M коровы (Ungar-Waron *et al.*, 1989).

Также имеется описание аналогичного твердофазного ИФА с использованием антител кролика к Иг G коровы, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Кроме того, разработан конкурирующий твердофазный ИФА, имеющий 98% специфичность (Tsuda *et al.*, 2004); в продаже имеется соответствующий комплект.

### 3. Вирус Шмалленберга

Испытания методом серологических реакций выполняются на образцах сыворотки или плазмы крови. Наиболее часто используемыми являются: i) испытания методом твердофазного ИФА с использованием реагентов собственного производства или с использованием нескольких комплектов (непосредственных или конкурирующих), которые в настоящее время продаются несколькими компаниями; ii) испытание методом непрямой реакции иммунофлюоресценции; iii) испытание методом НВ.

Первые международные межлабораторные сравнения показали, что испытание методом НВ является более чувствительным по сравнению с используемыми системами твердофазного ИФА (van der Poel *et al.*, 2014).

### **3.1. Твердофазный иммуоферментный анализ**

Разработаны различные типы твердофазного ИФА (Breard *et al.*, 2013; van der Heijden *et al.*, 2013), комплекты для проведения которых продаются различными компаниями.

Данные системы можно разделить на непрямые твердофазные ИФА на основе рекомбинантного N-протеина или полных вирусных препаратов или конкурирующие твердофазные ИФА с использованием нуклеопротеин-специфических моноклональных антител.

### **3.2. Реакция нейтрализации вируса**

Имеются описания реакции НВ с использованием клеток Vero или клеток ПДХ на плоскодонном 96-луночном микротитрационном планшете (Loeffen *et al.*, 2012; Mansfield *et al.*, 2013).

Испытание методом нейтрализации вируса обычно проводится с использованием сыворотки на 96-луночном микротитрационном планшете в среде для культивирования клеток, содержащей антибиотика. В исключительных случаях, когда отсутствует сыворотка, испытание может проводиться с использованием плазмы, однако в этом случае пропорции разведения  $<1/20$  не могут быть эффективно оценены (Wernike *et al.*, 2013).

#### **3.2.1. Методика**

i) Инактивируйте тест-сыворотку путем выдерживания ее при температуре 56°C в течение 30 минут на водяной бане.

ii) Выполните последовательное двукратное разведение сыворотки в среде в пропорциях от 1/5 до 1/640 на 96-луночном плоскодонном микротитрационном планшете с использованием удвоенных (дублированных) или учетверенных лунок и с добавлением 50 мкл в каждую лунку.

Добавьте в лунки первого ряда 80 мкл, а в лунки других рядов – 50 мкл культуральной питательной среды. Добавьте 20 мкл образца сыворотки в лунки первого ряда. Возьмите 50 мкл препарата на стадии первого разведения (пропорция разведения 1/5), добавьте в следующий ряд, смешайте и продолжайте проводить последовательное разведение. Добавьте последние 50 мкл. Теперь каждая лунка содержит 50 мкл сыворотки, разбавленной в культуральной среде.

Стандартные контрольные сыворотки (позитивные и негативные контрольные сыворотки) готовятся аналогичным образом.

iii) Добавьте в каждую лунку с 50 мкл вирусного препарата 100 полуинфицирующих доз (100 TCID<sub>50</sub>/50 мкл) культуры ткани (2000 TCID<sub>50</sub>/мл). Необходимое количество тест-вируса (приблизительно 5 мл на микротитрационный планшет) должно быть приготовлено в рамках одной серии.

В дополнение к позитивным и негативным контрольным сывороткам, должна быть приготовлена контрольная культура клеток (100 мкл культуральной среды без сыворотки и вируса), а также контрольная сыворотка без вируса (пропорция разведения 1/5).

В каждом испытании должна выполняться обратная титрация тест-вируса. Разведение вируса, используемого в испытании, осуществляется в 2 шага двукратного разведения в удвоенных или учетверенных лунках, начиная с пропорции 1/10 и заканчивая пропорцией 1/1280. Лунки предварительно заполняются 180 мкл культуральной среды, после чего добавляется 20 мкл суспензии тест-вируса при пропорции разведения 1/10 и окончательно разводится.

iv) Накройте препараты на микротитрационном планшете и выполняйте инкубацию в течение 2 часов при температуре 37°C во влажной камере в присутствии CO<sub>2</sub>. В течение этого времени осуществляется процесс нейтрализации вируса.

v) По истечении периода инкубации добавьте 100 мкл соответствующей клеточной суспензии в каждую лунку. Отрегулируйте плотность клеток таким образом, чтобы по истечении 24 часов сформировался непрерывный слой клеток. Для осуществления инкубации микротитрационный планшет должен оставаться во влажной среде (влажной камере в присутствии CO<sub>2</sub>).

vi) Осуществляйте инкубацию препаратов на планшете при температуре 34–37°C в течение 3–4 дней во влажной инкубационной камере в присутствии CO<sub>2</sub>.

vii) Оценка выполняется путем оценки цитопатического действия. Окончательное чтение результатов производится на 3-й или 4-й день после выполнения испытания.

Реакция считается действительной, если показатели обратного титрования составляют от 30 до 300 полуинфицирующих доз культуры ткани (TCID<sub>50</sub>), и позитивная контрольная сыворотка демонстрирует указанный титр (± один шаг двукратного разведения).

Вычисляемый титр антитела составляет ND<sub>50</sub> (Behrens and Kärber).

Титр нейтрализации =  $V-d \times (S-0,5)$

V: логарифмическое значение (log) объема 100% позитивной сыворотки первого разведения

d: логарифмическое значение (log) коэффициента разведения (как правило, составляет 0,3)

S: сумма количеств позитивных реагентов – от 0 до 100%/число реагентов на одно разведение

#### **4. Вирус-возбудитель болезни найробианских овец**

##### **4.1. Непрямой метод флюоресцирующих антител**

Испытание непрямым методом флюоресцирующих антител (МФА) является наиболее подходящим методом испытаний с использованием вирусов, входящих с серологическую группу *найровирусов*. Однако в данном случае возникают перекрестные реакции, в частности, с вирусом Dugbe, а также с другими представителями этой группы, такими как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки и вирус Kure (Davies *et al.*, 1978). Титры антитела к вирусу БНО варьируются от 1/640 до 1/10 240, и такие титры не

получаются при взаимодействии антисыворотки с другими представителями данной группы (Davies *et al.*, 1976).

Этот метод использовался в эпидемиологических исследованиях, а также при исследовании реакций на экспериментальные вакцины. Согласно результатам испытаний, какие-либо серологические различия между 40–50 исследованными изолятами отсутствуют. Штамм I-34<sup>3</sup> вируса БНО обычно использовался для приготовления антигена и адаптировался к условиям выращивания в клетках ПДХ-21-С13 после серии пассажей.

Антиген к вирусу в клеточном субстрате по выбору может выращиваться на открытых покровных стеклах, многолуночных планшетах, предметных стеклах микротитрационных планшетов для испытаний с тефлоновым покрытием. Метод, в котором используются предметные стекла с тефлоновым покрытием, описан.

#### **4.1.1. Приготовление предметных стекол с антигеном**

i) Помойте и простерилизуйте предметные стекла с тефлоновым покрытием. Данная процедура осуществляется в течение короткого времени с помощью горячего моющего средства, используемого для очистки лабораторных стеклянных сосудов и принадлежностей для культуры клеток тканей, затем предметные стекла трижды промываются под краном в течение 30 минут. Полоскание каждого стекла водой под краном осуществляется после его промывки в дистиллированной/деионизированной воде. Затем предметные стекла на 10 минут помещаются в 70% раствор спирта, вынимаются с помощью стерильных пинцетов и заворачиваются в жиронепроницаемую бумагу. После этого предметные стекла считаются стерильными, однако рекомендуется провести также их стерилизацию в СВЧ-печи, состоящую из двух циклов по 5 минут каждый.

ii) Поместите предметные стекла на стерильные планшеты с помощью стерильных пинцетов; лучше использовать квадратные планшеты из полистирола, чем их аналоги круглой формы.

iii) Смешайте суспензию из клеток ПДХ, содержащую примерно 25 000 клеток/мл, со средой для выращивания клеток ПДХ (как правило, в качестве среды для выращивания клеток ПДХ используется среда Игла) и добавьте 1000 полуинфицирующих доз культуры ткани (1000 TCID<sub>50</sub>) штамма I-34 вируса БНО на мл. Перемешайте получившуюся массу с помощью пипетки. Приготовьте несколько негативных неинфицированных контрольных препаратов.

iv) Добавьте инфицированные клетки в объемы по 50 мкл (для 12-луночных планшетов) или в соответствии с размером лунок предметных стекол с тефлоновым покрытием. Снимите крышки с планшетов и поместите препараты во влажную камеру-инкубатор с CO<sub>2</sub> или в контейнер для анаэробного культивирования.

v) Оставьте препараты на ночь для формирования монослоя. Затем извлеките предметные стекла из инкубатора в шкаф с ламинарным потоком воздуха, и добавляйте в препараты стабилизирующую среду с помощью пипетки, нанося ее на предметные стекла слоем глубиной 2–3 мм. Верните в инкубатор.

---

<sup>3</sup> Штамм I-34 представлял собой вирулентный изолят вируса БНО, полученный в Кении, который широко использовался в качестве эталонного (референтного) штамма в лаборатории Кабете – Кенийский сельскохозяйственный научно-исследовательский институт, а/я 14733 – 00800, Найроби, Кения.

vi) Соберите предметные стекла с антигеном сразу после того, как очаги ЦПД начнут обнаруживаться. Это произойдет в течение 36–56 часов (более точно оптимальное время сбора может быть определено путем фиксации и окрашивания одного предметного стекла по истечении 24, 36 и 48 часов).

vii) Предметные стекла трижды промываются в ФСБ и высушиваются. Затем осуществляется их фиксация с помощью сухого жара (минимальная температура 80°C) или с помощью охлажденного до состояния замерзания ацетона в течение 10 минут. После этого предметные стекла оборачиваются бумагой и могут храниться при температуре 4°C в течение 2–3 месяцев или при температуре –20°C в течение 1–2 лет. Предметные стекла, хранящиеся при температуре –20°C, перед использованием должны быть перенесены в помещение с температурой окружающей среды 4°C и оставлены в этом помещении на ночь.

Затем могут быть проведены аналогичные процедуры для приготовления антигена на покровных стеклах или многолуночных планшетах для клеточных культур. Несмотря на это, при использовании многолуночных планшетов для клеток культуры тканей Nunc, фиксация должна осуществляться с помощью 75% раствора ацетона.

#### 4.1.2. Методика

i) Увлажните предметные стекла путем добавления капли ФСБ в лунки с помощью пипетки Пастера. Определите число предметных стекол в соответствии с числом испытываемых сывороток. Включите в данную серию контрольные позитивные и негативные сыворотки, содержащие инфицированные и неинфицированные культуры клеток.

ii) Добавьте ФСБ и растворы сыворотки в пропорциях разведения 1/80–1/2560 в предварительно установленном порядке в лунки с 1 по 6. Предпочтительно дублировать каждое разведение на той же стороне.

iii) Поместите предметные стекла на планшеты и выдерживайте их при температуре 37°C во влажном инкубаторе в течение 40 минут.

iv) Трижды промойте предметные стекла на стойках с помощью ФСБ. Длительность каждого цикла промывки стекол должна составлять 5 минут.

v) Добавьте антивидовой конъюгат, конъюгированный флюоресцеином (обычно используются конъюгированные антитела к иммуноглобулину овец и козлов) с соблюдением предварительно установленной пропорции разведения; одна капля конъюгата может быть добавлена в каждую лунку с помощью пипетки Пастера или пипеток другого типа.

vi) Выполняйте инкубацию вышеописанным способом в течение 30 минут.

vii) Трижды промойте в ФСБ и высушите предметные стекла.

viii) Изучите предметные стекла, используя метод флюоресцентной микроскопии. Антиген к вирусу БНО находится в цитоплазме клетки, и под микроскопом будут видны очаговые скопления флюоресцирующих клеток ПДХ. Антиген, как правило, обнаруживается в мелких флюоресцирующих частицах, однако могут обнаруживаться и более крупные скопления антигена, имеющие неправильную форму. Такие скопления часто окружают

ядро или представляют собой веретенообразные массы, заполняющие цитоплазму у полюса клеток. Эти частицы не будут видны при использовании негативных сывороток и в неинокулированной контрольной культуре клеток.

ix) Сыворотки, демонстрирующие указанные флюоресцентные свойства при пропорциях разведения 1/640 и 1/1280, свидетельствуют о недавнем заражении вирусом БНО (Davies *et al.*, 1976).

## 4.2. Прочие реакции

Проведение испытаний методом СК осложняется выраженной антикомплементарной активностью многих сывороток, полученных из крови овец.

Реакции ИДАГ успешно использовались для испытания неочищенных антигенов, приготовленных из инфицированных тканей овец, жидкостей культур клеток тканей или из материала головного мозга мышей. Гипериммунные сыворотки могут вырабатываться у овец, мышей или кроликов с целью их использования для проведения испытаний с зараженными тканями селезенки, полученными у овец, умерших от БНО, используемыми в качестве источника антигена для иммунизации.

Испытание методом твердофазного ИФА с использованием частично очищенного антигена, полученного из культуры клеток тканей, с целью тестирования антител, было описано. Данный метод подходит для использования в серологических исследованиях. Кроме того, испытание методом твердофазного ИФА должно использоваться также для проверки сомнительных результатов (Munz *et al.*, 1984).

Получены моноклональные антитела к антигенам штамма I-34 вируса БНО, которые оцениваются на предмет возможности их применения в качестве реагентов для диагностики.

Также были разработаны РНК-зонды с использованием малого (S) и среднего (M) сегментов генома вируса Dugbe. Эти зонды использовались для того, чтобы доказать, что серологическая группа вируса БНО рода найровирусов более тесно связана с серологической группой вируса конго-крымской геморрагической лихорадки, чем с любой другой из оставшихся серологических групп (Marriott *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1992). Эти зонды также могут использоваться в качестве потенциальных инструментов диагностики.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

### 1. Вирус долины Кэш

В связи со спорадическим характером возникновения вспышек данной болезни, вакцина против вируса-возбудителя этой болезни не разработана.

### 2. Вирус Акабане

Крупные вспышки болезни Акабане отмечались только в Японии и Австралии. Хотя вспышки болезни регистрировались через нерегулярные промежутки времени, разработанная вакцина способствовала успешному предотвращению гибели плода животных.

Инактивированная вакцина используется для иммунизации крупного рогатого скота и козлов. При изготовлении вакцины использовался либо формалин, либо инактивированные внутримышечные препараты с бета-пропиолактоном и гелевым адъювантом из фосфата алюминия. Две 3-мл дозы вводятся через 4-недельный интервал непосредственно перед периодом случки (спаривания) животных. Рекомендуется проводить повторную ежегодную вакцинацию. Вакцина безопасна для беременных животных. При проведении испытаний в полевых условиях после первой вакцинации у 88% животных наблюдалось активное производство антител к вирусу, а после введения второй дозы вакцины наблюдался 100% иммунный ответ (Kurogi *et al.*, 1978). Высокая эффективность вакцины была продемонстрирована с помощью испытаний в естественной среде.

В Японии продается живая вакцина против ВАКА. 1-мл доза вакцины вводится подкожно особям крупного рогатого скота до наступления периода активности насекомых-гематофагов, являющихся переносчиками вируса. Беременным особям крупного рогатого скота и телятам вакцина может вводиться подкожно, внутримышечно и внутричерепально. При использовании вакцины не было зарегистрировано случаев развития лейкопении, виремии или пирексии, и была продемонстрирована надлежащая реакция антител на вирус. Живая вакцина против ВАКА, безопасная для крупного рогатого скота, была испытана на беременных овцах. Во время проведения испытаний у некоторых овец наблюдалось развитие виремии, а в органах нескольких плодов был обнаружен вирус. Хотя каких-либо дефектов и пороков развития плода не наблюдалось, данную вакцину можно считать неподходящей для вакцинации овец.

### **3. Айнский вирус**

Разработаны инактивированные вакцины против айнского вируса, которые продаются в Японии. Инактивированная тривалентная вакцина (против айнского вируса, вируса Акабане и вируса Chuzan) прошла успешные испытания на крупном рогатом скоте (Kin *et al.*, 2011).

### **4. Вирус Шмалленберга**

Инактивированные вакцины против ВШБ лицензированы и продаются в некоторых европейских странах.

### **5. Вирус-возбудитель болезни найробианских овец**

Эпидемиологические исследования показали, что вспышки БНО не возникают в состоянии энзоотической стабильности. Причиной возникновения болезни являются перемещения животных из областей, в которых возбудитель болезни отсутствует, в области (зоны), в которых данная болезнь является эндемической, когда такие области определены. Изменения в экологической ситуации, способствующее распространению клещей, являющихся переносчиком вируса, приведет к расширению областей (зон) распространения болезни.

Для таких ситуаций были изготовлены экспериментальные вакцины. Одна вакцина состоит из вируса, аттенуированного 35 пассажами в организм взрослых мышей, однако такие вакцины могут вызвать тяжелые побочные реакции у некоторых пород овец и считаются небезопасными для общего использования. Аналогичная вакцина была разработана в городе Энтеббе (Уганда) путем последующих пассажей в мозг мыши,

однако после этого данная вакцина не производилась с целью ее использования на территории Уганды или других стран.

Штамм вируса БНО, адаптированный к культуре клеток тканей, был выращен для обеспечения высокого титра в культурах, выращенных в роллерных флаконах. После осаждения с помощью метанола, инактивации и добавления адьюванта было установлено, что данный штамм обеспечивает надежную защиту после введения двух доз вакцины через 14-дневный интервал. Ни одна из указанных вакцин не производится на регулярной основе, поскольку спрос на них является низким (Davies *et al.*, 1974; 1977b).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AKASHI H., ONUMA S., NAGANO H., OHTA M. & FUKUTOMI T. (1999). Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction. *Arch. Virol.*, **144**, 2101–2109.

BRÉARD E., LARA E., COMTET L., VIAROUGE C., DOCEUL V., DESPRAT A., VITOUR D., POZZI N., CAY A.B., DE REGGE N., POURQUIER P., SCHIRRMEIER J., HOFFMANN B., BEER M., SAILLEAU C. & ZIENTRA S. (2013). Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallerberg virus antibodies. *PLoS One*, **8** (1):e53446. doi: 10.1371/journal.pone.0053446. Epub 2013 Jan 15.

BEER M., CONRATHS F.J., VAN DER POEL W.H. (2012). „Schmallerberg virus“ – a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol. Infect.*, **141**, 1–8.

BILK S., SCHULZE C., FISCHER M., BEER M., HLINAK A. & HOFFMANN B. (2012). Organ distribution of Schmallerberg virus RNA in malformed newborns. *Vet. Microbiol.*, **159** (1–2), 236–238.

BIN TARIF A., LASECKA L., HOLZER B. & BARON M.D. (2012). Ganjam virus/Nairobi sheep disease virus induces a pro-inflammatory response in infected sheep. *Vet. Res.*, **43**, 71.

BLACKMORE C.G. & GRIMSTAD P.R. (1998). Cache Valley and Potosi viruses (*Bunyaviridae*) in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimental infections and antibody prevalence in natural populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**, 704–709.

BLACKSELL S.D., LUNT R.A. & WHITE J.R. (1997). Rapid identification of Australian bunyavirus isolates belonging to the Simbu serogroup using indirect ELISA formats. *J. Virol. Methods*, **66**, 123–133.

CALISHER C.H., FRANCY D.B., SMITH G.C., MUTH D.J., LAZUICK T.S., KARABATSOS N., JAKOB W.L. & MCLEAN R.G. (1986). Distribution of Bunyamwera serogroup viruses in North America, 1956–1984. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 429–443.

CAMPBELL G., MATA CZYNSKI J.D., REISDORF E.S., POWELL J.W., MARTIN D.A., LAMBERT A.J., HAUPT T.E., DAVIS J.P. & LANCIOTTI R.S. (2006). Second human case of Cache Valley virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 854–856.

CHUNG S.I., LIVINGSTON C.W. JR, EDWARDS J.F., CRANDELL R.W., SHOPE R.E., SHELTON M.J. & COLLISSON E.W. (1990). Evidence that Cache Valley virus induces congenital malformations in sheep. *Vet. Microbiol.*, **21**, 297–307.

- CHUNG S.I., LIVINGSTON C.W. JR, EDWARDS J.F., GAUER B.B. & COLLISSON E.W. (1990). Congenital malformations in sheep resulting from *in utero* inoculation of Cache Valley virus. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1645–1648.
- CLARKE D.H. & CASALS J. (1958). Techniques for hemagglutination and haemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.
- CRANDELL R.A., LIVINGSTON C.W. JR & SHELTON M.J. (1989). Laboratory investigation of a naturally occurring outbreak of arthrogryposis-hydrancephaly in Texas sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **1**, 62–65.
- CYBINSKI D.H., ST GEORGE T.D. & PAULL N.I. (1978). Antibodies to Akabane virus in Australia. *Aust. Vet. J.*, **54**, 1–3.
- DA COSTA MENDES V.M. (1984). The isolation and importance of Simbu group viruses in South Africa. Thesis for M. Med. Vet (Vir.) University of Pretoria, South Africa.
- DAVIES F.G. (1988). Nairobi sheep disease. *In: The Ecology of Arboviruses*, Vol. 3, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 191–203.
- DAVIES F.G. (1997). Nairobi sheep disease. *Parasitologia*, **39**, 95–98
- DAVIES F.G., CASALS J., JESSETT D.M. & OCHIENG P. (1978). The serological relationships of Nairobi sheep disease virus. *J. Comp. Pathol.*, **88**, 519–523.
- DAVIES F.G., JESSETT D.M. & OTIENO S. (1976). The antibody response of sheep following infection with Nairobi sheep disease virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**, 497–502.
- DAVIES F.G., MUNGAI J. & SHAW T. (1974). A Nairobi sheep disease vaccine. *Vet. Rec.*, **94**, 128.
- DAVIES F.G., MUNGAI J. & TAYLOR M. (1977a). The laboratory diagnosis of Nairobi sheep disease. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 75–80.
- DAVIES F.G., OTIENO S. & JESSETT D.M. (1977b). The antibody response in sheep vaccinated with experimental Nairobi sheep disease vaccines. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 181–183.
- EDWARDS J.F., KARABATSOS N., COLLISSON E.W. & DE LA CONCHA BERMEJILLO A. (1997). Ovine fetal malformations induced by *in utero* inoculation with Main Drain, San Angelo and LaCrosse viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **56**, 171–176.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2012). Joint ECDC/RIVM/RKI rapid risk assessment. New *Orthobunyavirus* isolated from cattle and small livestock – potential implications for human health. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER-Joint-ECDC-RIVM-RKI-Rapid-Risk-Assessment-Schmallenberg-virus-May-2012.pdf>
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (EDS) (2005). Bunyviridae family. *In: 8th Report of the International Committee on Taxonomy of*

Viruses. Academic Press, 1162 pp. Elsevier Publication Date: 27 May 2005  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>.

HOFFMANN B., SCHEUCH M., HÖPER D., JUNGBLUT R., HOLSTEG M., SCHIRRMEIER H., ESCHBAUMER M., GOLLER K.V., WERNIKE K., FISCHER M., BREITHAUPT A., METTENLEITER T.C. & BEER M. (2012). Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, **18** (3), 469–472.

HOLDEN P. & HESS A.D. (1959). Cache Valley Virus, a previously undescribed mosquito-borne agent. *Science*, **130**, 1187–1188.

HUANG C., SLATER B., CAMPBELL W., HOWARD J. & WHITE D. (2001). Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **94**, 121–128.

GARD G.P., WEIR R.P. & WALSH S.J. (1988). Arboviruses recovered from sentinel cattle using several virus isolation methods. *Vet. Microbiol.*, **18** (2), 119–125.

GOLLER KV, HÖPER D, SCHIRRMEIER H, METTENLEITER TC, BEER M (2012). Schmallenberg virus as possible ancestor of shamonda virus. *Emerg Infect Dis* 18: 1644-1666.

GOTO Y., INABA Y., MIURA Y., KUROGI H., TAKAHASHI E., SATO K., OMORI T., HANAKI T., SAZAWA H. & MATUMOTO M. (1978). Hamagglutination-inhibition test applied to the study of Akabane virus infection in domestic animals. *Vet. Microbiol.*, **3**, 89–99.

HOFFMANN B., SCHEUCH M., HOPER D., JUNGBLUT R., HOLSTEG M., SCHIRRMEIER H., ESCHBAUMER M., GOLLER K.V., WERNIKE K., FISCHER M., BREITHAUPT A., METTENLEITER T.C. & BEER M. (2012). Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, **18**, 469–472.

KARABATSOS N. (ED.) (1985). International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates, Third Edition. American Society for Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, USA.

KIN Y.H., KWEON C.H., TARK D.S., LIM S.I., YANG D.K., HYUN B.H., SONG J.Y., HUR W. & PARK S.C. (2011). Development of inactivated trivalent vaccine for the teratogenic Aino, Akabane and Chuzan viruses. *Biologicals*, **39**, 152–157.

KIRKLAND P.D., BARRY R.D., HARPER P.A. & ZELSKI R.Z. (1988). The development of Akabane virus-induced congenital abnormalities in cattle. *Vet. Rec.*, **122**, 582–586.

KUNO G., MITCHELL C.J., CHANG G.J. & SMITH E.C. (1996). Detecting Bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1184–1188.

KUROGI H., INABA Y., TAKAHASHI E., SATO K., GOTO Y., SATODA K. & OMORI T. (1978). Development of inactivated vaccine for Akabane disease. *Natl Inst. Anim. Health Q.*, **18**, 97–108.

LEE J.K., PARK J.S., CHOI J.H., PARK B.K., LEE B.C., HWANG W.S., KIM J.H., JEAN Y.H., HARITANI M., YOO H.S. & KIM D.Y. (2002). Encephalomyelitis associated with akabane virus infection in adult cows. *Vet. Pathol.*, **39** (2), 269–273.

LOEFFEN W., QUAK S., DE BOER-LUIJTZE E., HULST M., VAN DER POEL W., BOUWSTRA R. & MAAS R. (2012). Development of a virus neutralisation test to detect antibodies against Schmallenberg virus and serological results in suspect and infected herds. *Acta Vet. Scand.*, **54**, 44.

MANSFIELD K.L., LA ROCCA S.A., KHATRI M., JOHNSON N., STEINBACH F. & FOOKS A.R. (2013). Detection of Schmallenberg virus serum neutralising antibodies. *J. Virol. Methods*, **188** (1-2), 139–144.

MARRIOTT A.C., WARD V.K., HIGGS S. & NUTTALL P.A. (1990). RNA probes detect nucleotide sequence homology between members of two different nairovirus serogroups. *Virus Res.*, **16**, 77–81.

MEEGAN J.M., YEDLOUTSCHNIG R.J., PELEG B.A., SHY J., PETERS C.J., WALKER J.S. & SHOPE R.E. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to RVF virus in ovine and bovine sera. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1138–1141.

MIYAZATO S., MIURA Y., HASE M., KUBO M., GOTO Y. & KONO Y. (1989). Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus. *Nihon Juigaku Zasshi*, **51** (1), 128–136.

MORELI M.L., AQUINO V.H. & FIGUEIREDO L.T. (2001). Identification of Simbu, California and Bunyamwera serogroup bunyaviruses by nested RT-PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **95**, 108–113.

MUNZ E., REIMANN M., FRITZ T. & MEIER K. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Nairobi sheep disease virus in comparison with an indirect immunofluorescent and haemagglutination test. II. Results observed with sera of experimentally infected rabbits and sheep and with African sheep sera. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **31**, 537–549.

NODA Y., YOKOYAMA H., KATSUKI T., KURASHIGE S., UCHINUNO Y. & NARITA M. (2001). Demonstration of Akabane virus antigen using immunohistochemistry in naturally infected newborn calves. *Vet. Pathol.*, **38**, 216–218.

PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J. & MCPHEE D.A. (1982). Pathogenesis and virulence studies of Australian simbu serogroup bunyaviruses. In: *Viral Diseases in Southeast Asia and the Western Pacific*, Mackenzie J.S., ed. Academic Press, Sydney, Australia, 644–647.

PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J. & SNOWDON W.A. (1975). Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect. Immun.*, **15**, 254–262.

QIAO J., WANG J., MENG Q., WANG G., LIU Y., HE Z., YANG H., ZHANG Z., CAI X. & CHEN C. (2013). Rapid detection of Akabane virus by a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP). *Virol. J.*, **10**, 288.

REUSKEN C., VAN DEN WIJNGAARD C., VAN BEEK P., BEER M., BOUWSTRA R., GODEKE G-J, ISKEN L., VAN DEN KERKHOF H., VAN PELT W., VAN DER POEL W., REIMERINK J., SCHIELEN P., SCHMIDT-CHANASIT J., VELLEMA P., DE VRIES A., WOUTERS I. & KOOPMANS M. (2012). Lack of evidence for zoonotic transmission of Schmallenberg virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 1746–1754.

- RODRIGUES HOFFMANN A., WELSH C.J., WILCOX VARNER P., DE LA CONCHA-BERMEJILLO A., MARCHAND BALL J., AMBRUS A. & EDWARDS J.F. (2012). Identification of the target cells and sequence of infection during experimental infection of ovine fetuses with Cache Valley virus. *J. Virol.*, **86**, 4793–4800.
- SAHU S.P., PEDERSEN D.D., RIDPATH H.D., OSTLUND E.N., SCHMITT B.J. & ALSTAD D.A. (2002). Serologic survey of cattle in the northeastern and north central United States, Virginia, Alaska, and Hawaii for antibodies to Cache Valley and antigenically related viruses (Bunyamwera serogroup virus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67** (1), 119–122.
- SEXTON D.J., ROLLIN P.E., BREITSCHWERDT E.B., COREY G.R., MYERS S.A., DUMAIS M.R., BOWEN M.D., GOLDSMITH C.S., ZAKI S.R., NICHOL S.T., PETERS C.J. & KSIAZEK T.G. (1997). Life-threatening Cache Valley virus infection. *N. Engl. J. Med.*, **336**, 547–549.
- SHEPHERD N.C., GEE C.D., JESSEP T., TIMMINS G., CARROLL S.N. & BONNER R.B. (1978). Congenital bovine epizootic arthrogryposis and hydranencephaly. *Aust. Vet. J.*, **54**, 171–177.
- STRAM Y., KUZNETZOVA L., GUINI M., ROGEL A., MEIROM R., CHAI D., YADIN H. & BRENNER J. (2004). Detection and quantitation of akabane and aino viruses by multiplex real-time reverse-transcriptase PCR. *J. Virol. Methods*, **116**, 147–154.
- TSUDA T., YOSHIDA K., OHASHI S., YANASE T., SUEYOSHI M., KAMIMURA S., MISUMI K., HAMANA K., SAKAMOTO H. & YAMAKAWA M. (2004). Arthrogryposis, hydranencephaly and cerebellar hypoplasia syndrome in neonatal calves resulting from intrauterine infection with Aino virus. *Vet. Res.*, **35**, 531–538.
- TSUDA T., YOSHIDA K., YANASE T., OHASHI S. & YAMAKAWA M. (2004). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the antibodies specific to akabane virus. *J Vet Diagn Invest.*, **16** (6), 571–576.
- UNGAR-WARON H., GLUCKMAN A. & TRAININ Z. (1989). ELISA test for the serodiagnosis of Akabane virus infection in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.*, **21**, 205–210.
- VAN DEN BROM R., LUTTIKHOLT S.J., LIEVAART-PETERSON K., PEPERKAMP N.H., MARS M.H., VAN DER POEL W.H. & VELLEMA P. (2012). Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallerberg virus infection. *Tijdschr. Diergeneeskd*, **137**, 106–111.
- VAN DER HEIJDEN H.M., BOUWSTRA R.J., MARS M.H., VAN DER POEL W.H., WELLENBERG G.J. & VAN MAANEN C. (2013). Development and validation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Schmallerberg virus in blood samples from ruminants. *Res Vet Sci.*, **95** (2), 731–735.
- VAN DER POEL W.H., CAY B., ZIENTARA S., STEINBACH F., VALARCHER J.F., BØTNER A., MARS M.H., HAKZE-VAN DER HONING R., SCHIRRMEIER H. & BEER M. (2014). Limited interlaboratory comparison of Schmallerberg virus antibody detection in serum samples. *Vet. Rec.*, Mar 3. doi: 10.1136/vr.102180. [Epub ahead of print]

WANG H., NATTANMAI S., KRAMER L.D., BERNARD K.A. & TAVAKOLI N.P. (2009). A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of California serogroup and Cache Valley viruses. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **65**, 150–157.

WARD V.K., MARRIOTT A.C., POLYZONI T., EL GHORR A.A., ANTONIADIS A. & NUTTALL P.A. (1992). Expression of the nucleocapsid protein of Dugbe virus and antigenic cross-reactions with other nairoviruses. *Virus Res.*, **24**, 223–229.

WERNIKE K., ESCHBAUMER M., SCHIRRMEIER H., BLOHM U., BREITHAUPT A., HOFFMANN B. & BEER M. (2013). Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallerberg virus in cattle. *Vet. Microbiol.*, **165** (1–2), 155–159.

YANASE T., KATO T., AIZAWA M., SHUTO Y., SHIRAFUJI H., YAMAKAWA M. & TSUDA T. (2012). Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus *Orthobunyavirus* in nature: implications for their genetic relationship to Shmallenberg virus. *Arch. Virol.*, **157**, 1611–1616.

ZELLER H. & BOULOY M. (2000). Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 79–91.

\* \* \*

Для получения более подробной информации, референтных материалов и рекомендаций относительно вируса Шмалленберга обращайтесь в Институт Фридриха Лёффлера (о. Римс, Германия)