

## ГЛАВА 2.1.14.

### **БОЛЕЗНИ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ВИРУСОМ НИПАХ И ХЕНДРА**

---

#### **РЕЗЮМЕ**

*Вирус Хендра и вирус Нипах впервые были выявлены в последнем десятилетии двадцатого века во время вспышек респираторного и неврологического заболевания, наблюдавшегося у нескольких видов животных и у человека. В 1994 г. вирус Хендра стал причиной тяжелого респираторного заболевания и гибели 13 лошадей и их тренера в одной из конюшен в г. Брисбене, Австралия. Случаи заражения людей вирусом Нипах выявили в период с сентября 1998 г. по апрель 1999 г. в Малайзии в ходе исследования случаев острого энцефалита со смертельным исходом, последовавших за вспышкой тяжелого респираторного заболевания неустановленной этиологии в популяции свиней. Чтобы остановить распространение болезни пришлось выбраковать более одного миллиона свиней. Заражение вирусом Хендра привело к смерти 4 из 7 инфицированных человек в Австралии; 585 случаев заражения людей вирусом Нипах, включая 300 случаев со смертельным исходом, были зарегистрированы в Малайзии, Сингапуре, Бангладеш и Индии. В последнее время о случаях энцефалита со смертельным исходом, связанных с вирусом Нипах, сообщали с Филиппинских островов, где погибли 9 из 17 инфицированных пациентов. Естественными хозяевами обоих вирусов являются плодовые представители семейства крылановых, в частности, виды, принадлежащие к роду летучих лисиц (*Pteropus*).*

*Инфекция вирусом Нипах у лошадей проявляется высокой температурой тела, отеком морды, тяжелой респираторной недостаточностью и – в терминальной стадии – обильными пенистыми выделениями из носа. Также могут наблюдаться нарушения координации движений и конические судороги мышц. У некоторых лошадей болезнь манифестирует неврологическими признаками, в то время как у других возможно наличие коликообразных симптомов. Среди самых частых находок во время патологоанатомического обследования отмечают расширение лимфатических сосудов легких, тяжелый отек и застой в легких. Основным поражением считают генерализованное поражение мелких сосудов сразу нескольких органов. В капиллярах и артериолах антиген вируса часто обнаруживают в эндотелиальных клетках, образующих синцитий. Инфекция вирусом Хендра у лошадей не всегда приводит к смертельному исходу, и некоторым животным с клиническими признаками болезни удается выжить. Вирус Хендра, по-видимому, не отличается высокой контагиозностью у лошадей, и для его распространения требуется довольно тесный контакт между животными. Случаи передачи вируса от инфицированных лошадей на пастбищах отмечали редко. Однако в более замкнутом пространстве вероятность заражения более высока.*

*Вирус Нипах отличается высокой степенью заразности у свиней, но изначально инфекцию этим вирусом не выделили в отдельное заболевание ввиду того, что*

показатели заболеваемости и смертности были не очень высокими, а клиническая картина существенно не отличалась от других известных болезней свиней в Малайзии. Основываясь на наблюдениях, сделанных во время вспышки и экспериментальных инфекций, болезнь, вызванная вирусом Нипах у свиней, характеризуется лихорадкой с респираторными и, часто, неврологическими нарушениями, хотя ряд случаев протекали субклинически. У некоторых больных животных наблюдался громкий лающий кашель. У свиноматок регистрировали случаи аборт. У свиноматок и хряков болезнь иногда протекала в сверхострой форме со смертельным исходом. Иммуногистохимическое исследование свидетельствует о поражении дыхательных путей (трахеит и бронхиальная и интерстициальная пневмония) и/или головного мозга (менингит) инфицированных животных. Синцитиальные клетки, содержащие антиген вируса, обнаруживают в мелких сосудах, лимфатических сосудах и эпителии дыхательных путей.

Оба вируса способны поражать домашних питомцев. В экспериментальных условиях вирус Хендра вызывал инфекцию легких у кошек, схожую с таковой у лошадей, в то время как у собак клинических признаков не наблюдалось. Клиническая картина при естественном заражении собак вирусом Нипах практически не отличается от таковой при чуме плотоядных; показатели смертности также довольно высоки, хотя результаты анализов крови показывают, что некоторые собаки выживают. В экспериментальных условиях вирус Нипах вызывает у кошек болезнь, схожую с инфекцией вирусом Хендра. В случаях заражения вирусом Нипах и вирусом Хендра у кошек и в случаях инфекции вирусом Нипах у собак антиген вируса обнаруживали в эндотелиальных клетках, образующих синцитий.

Заражение человека происходит при контакте с больным животным, как правило, с амплифицирующим, а не с естественным хозяином: вирус Нипах чаще передается при контакте со свиньями, а вирус Хендра – с лошадьми. Однако изучение вспышек вируса Нипах среди населения в Бангладеш выявили случаи передачи вируса человеку от летучих лисиц без участия промежуточного/амплифицирующего хозяина. В Малайзии и Сингапуре не было зарегистрировано случаев передачи вирусов Нипах или Хендра от человека к человеку, хотя во время вспышек в Бангладеш иногда возникало подозрение на передачу вируса Нипах от человека к человеку.

Вирусы Хендра и Нипах являются близкородственными членами рода *Henipavirus*, подсемейство *Paramyxovirinae*, семейство *Paramyxoviridae*. Вирусы Хендра и Нипах относятся к опасным патогенам человека, требующим, согласно анализу управления рисками в лаборатории, обеспечения условий 4 уровня биобезопасности. Образцы от животных с подозрением на инфекцию следует транспортировать в авторизованные лаборатории при строгом соблюдении требований к биобезопасности согласно международным регламентам.

**Идентификация возбудителя:** Вирусы Хендра и Нипах можно вырастить в нескольких клеточных культурах. Выделение вируса из незафиксированных полевых образцов возможно, но только в ситуациях, когда можно обеспечить безопасность лица, осуществляющего манипуляции. После выделения вируса для его идентификации используют методы иммуноокрашивания инфицированных клеток, нейтрализации с помощью специфичных антисывороток к вирусам, а также методы молекулярной

характеристики. В качестве диагностических тестов теперь применяют и полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и ПЦР в реальном времени.

Антиген вируса обнаруживают в сосудистой эндотелии, а в случае с инфекцией вирусом Нипах у свиней – в эпителии дыхательных путей. Иммуногистохимическое исследование позволяет выявить антиген вирусов Нипах и Хендра в различных тканях, зафиксированных формалином. На иммуногистохимическое исследование обычно направляют образцы легких, селезенки, почек и разных слоев головного мозга, включая его оболочки. У беременных животных или в случаях абортот также отбирают образцы матки, плаценты и тканей плодов. Для выделения вирусов и их обнаружения молекулярными методами забирают образцы тех же свежих тканей инфицированных органов и/или образцы мочи, мазки из зева или носа.

**Серологические тесты:** Разработаны реакции нейтрализации вируса (РНВ) и твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА). Иммуоферментный анализ в настоящее время применяют в качестве скрининг-теста, а РНВ – в качестве эталонной процедуры и подтверждающего теста. Поскольку антитела к вирусу Хендра дают небольшую перекрестную реакцию с антителами к вирусу Нипах, РНВ с использованием только одного из вирусов не обеспечивает достаточной специфичности для идентификации вируса. Нейтрализующие антитела к вирусу Нипах дифференцируют от антител к вирусу Хендра по их более выраженной способности блокировать гомологичный вирус по сравнению с гетерологичным. Данный феномен не будет служить существенным ограничением во время вспышек, когда этиология инфекции уже установлена, однако образцы сывороток от животных или лиц с подозрением на инфекцию или образцы из других регионов кроме Австралии и Малайзии следует направлять на анализ в реакции нейтрализации обоих вирусов. Учитывая серологическое родство между вирусами Нипах и Хендра, для обнаружения антител к обоим вирусам можно использовать метод ИФА с антигеном вируса Нипах или вируса Хендра.

**Требования к вакцинам и диагностическим биопрепаратам:** Существует вакцина против вируса Хендра, зарегистрированная для применения у лошадей в Австралии. На данный момент не существует вакцин против вируса Нипах.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Вирус Хендра и вирус Нипах принадлежат к семейству *Paramyxoviridae* подсемейства *Paramyxovirinae*, род *Henipavirus* и обладают морфологическими и физико-химическими свойствами, типичными для парамиксовирусов. Данные патогены относятся к плеоморфным и оболочечным вирусам с нуклеокапсидами в форме «елочки». Вирионы имеют размер от 40 до 600 нм в диаметре. Липидная оболочка вириона содержит гликопротеины и белки слияния, образующие шипы на ее поверхности. Геномы вирусов Хендра и Нипах представлены одноцепочечными нефрагментированными РНК отрицательной полярности (18,2 п.н.) и состоят из 6 генов, кодирующих 6 основных структурных белков: N (нуклеокапсидный белок), Р (фосфопротеин), М (матричный белок), F (белок слияния), G (гликопротеин) и L (большой белок).

Естественными хозяевами вирусов Нипах и Хендра в природе являются плодоядные крыланы (их часто называют «летучими лисицами»), которые относятся к роду *Pteropus*, семейство *Pteropodidae*. Антитела к вирусу Хендра обнаруживают у всех четырех видов летучих лисиц Австралии, при этом серопревалентность варьирует в зависимости от времени года и места. Серологические исследования с выявлением антител к вирусу Нипах свидетельствуют о присутствии таких антител у 75% крыланов в Малайзии (Johara et al., 2001; Sohayati et al., 2011; 2013). Антитела к вирусу Нипах или предположительно близкородственным вирусам впоследствии обнаруживали у летучих лисиц на большей части их естественного ареала: в Бангладеш, Камбодже (Olson et al., 2002; Reynes et al., 2005), Индонезии (Sendow et al., 2006), на Мадагаскаре (Iehle et al., 2007) и в Таиланде (Wacharapluesadee et al., 2005). Вирус Хендра выделяли у летучих лисиц в Австралии (Halpin et al., 2000), а вирус Нипах – у летучих лисиц в Малайзии и Камбодже (Chua et al., 2002; Reynes et al., 2005; Sohayati et al., 2001). С помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией РНК вируса Нипах обнаруживали в моче, слюне и крови крыланов в Таиланде (Wacharapluesadee и Hemachudha, 2007; Wacharapluesadee et al., 2005). В Гане 39% пальмовых крыланов (*Eidolon helvum*) имели антитела к вирусу Нипах (Neuman et al., 2008). У пальмовых крыланов в Гане также обнаруживали последовательности, характерные для генипавирусов (Neuman et al., 2008). Выявление антител к генипавирусам и характерных для них последовательностей у африканских летучих мышей позволяет предположить, что диапазон инфекций вирусом Нипах может быть шире, чем считалось ранее, хотя случаев заражения людей вирусом Нипах не регистрировали нигде кроме Юго-Восточной Азии.

Вирус Хендра впервые был выделен в Брисбене, Австралия, в сентябре 1994 года во время вспышки острой респираторной инфекции, ставшей причиной гибели 13 лошадей и их тренера (Murrey et al., 1995). Сначала новый вирус назвали морбилливирусом лошадей, но дальнейшие генетические исследования показали, что по своим характеристикам он не достаточно похож на морбилливирусы и не может быть включен в этот род. В северном Квинсленде регистрировали и другие случаи заражения лошадей вирусом Хендра со смертельным исходом, а также новые случаи инфекции у людей. За месяц до вспышки в Брисбене в результате острой инфекции погибли две лошади, однако, вирус Хендра в качестве возбудителя инфекции назвали только после того, как хозяин лошадей, который, по-видимому, заразился вирусом во время аутопсии животных, умер спустя 13 месяцев в результате энцефалита, вызванного заражением этим вирусом (Rogers et al., 1996). После этого было зарегистрировано более 40 вспышек, затронувших более 75 лошадей, при этом только в двух случаях болезнь поразила более трех животных. Четыре из семи случаев инфекции у людей завершились смертельным исходом (57%). Все инфицированные люди находились в очень тесном контакте с жидкостями организмов больных лошадей во время проведения инвазивных процедур и/или не пользовались всеми средствами индивидуальной защиты.

В Малайзии ретроспективные исследования архивированных гистологических проб показывают, что с 1996 года вирус Нипах становился причиной гибели свиней в ряде случаев, однако это установили уже после 1999 года, когда вирус Нипах впервые выделили во время вспышки энцефалита у людей, начавшейся в 1998 году (Chua et al., 2000; Nor et al., 2000). В отличие от респираторного заболевания, вызываемого вирусом Хендра у лошадей, которое часто заканчивалось смертельным исходом, но

характеризовалось довольно низкой контагиозностью (Williamson et al., 2001), связанная с вирусом Нипах респираторная инфекция у свиней, как правило, характеризовалась субклиническим течением, но более высокой степенью заразности (Hooper et al., 2001), и именно эти свойства вируса Нипах привели к его быстрому распространению в популяции свиней в Малайзии и заставили власти прибегнуть к выбраковке как к главному средству борьбы с распространением патогена (Nor et al., 2000). Более одного миллиона свиней были уничтожены; 106 из 267 (39%) инфицированных людей – преимущественно свиноводы в Малайзии и работники боен в Сингапуре, которые контактировали с живыми животными – умерли от энцефалита (Chua et al., 2000; Paton et al., 1999). Во время этой вспышки в неблагополучных хозяйствах также регистрировали случаи заражения среди кошек, собак и лошадей (Hooper et al., 2001; Nor et al., 2000), хотя эти случаи не считали эпидемиологически значимыми.

В последующие годы среди населения Бангладеш почти ежегодно регистрировали новые вспышки заболевания, вызванного вирусом Нипах; несколько вспышек также зафиксировали в граничившей с Бангладеш Индии – в штате Западная Бенгалия. Во время вспышек заболевания среди населения в 2001 и 2003 годах не удалось установить источник заражения среди домашних животных, однако, в данной местности обитают индийские летучие лисицы *Pteropus giganteus*, у которых были выявлены антитела к вирусу Нипах. Изучение кластеров вспышек и временной последовательности продемонстрировало, что передача инфекции от человека к человеку все-таки возможна, хотя и на низком уровне. Во время другой вспышки в 2004 году, когда инфекция привела к смерти 27 из 36 (75%) зараженных людей, были получены эпидемиологические данные, свидетельствующие о передаче вируса от человека к человеку, а серологические исследования выявили антитела к вирусу у летучих лисиц, обитающих в данной местности. Предполагается, что одним из вероятных путей передачи инфекции от дикого животного, являющегося естественным резервуаром вируса, может быть свежий сок финиковой пальмы, контаминированный слюной, мочой или экскрементами летучих мышей (Luby et al., 2006). В результате периодических вспышек инфекции вирусом Нипах в Малайзии, Сингапуре, Бангладеш и Индии было зарегистрировано более 585 случаев заражения людей, 334 из которых закончились смертельным исходом (57%).

В 2014 году на Филиппинах была зарегистрирована вспышка инфекции вирусом Нипах среди населения, которая с эпидемиологической точки зрения существенно отличалась от более ранних вспышек. В этот раз инфекция привела к гибели 9 из 17 зараженных лиц (Ching et al., 2015). Во время этой вспышки причиной инфицирования людей стало потребление мяса лошадей, забитых в связи с поражением острым энцефалитом. Возможность передачи инфекции от человека к человеку также была принята во внимание. Имело место и заражение кошек и собак.

Постановка диагноза в случае заражения генипавирусами основана на выделении вируса, обнаружении вирусной РНК в клинических или патологоанатомических пробах или на демонстрации антигена вируса в образцах тканей, отобранных во время аутопсии (Daniels et al., 2001). Полезным также может стать обнаружение специфичных антител, особенно, у свиней, у которых заражение вирусом Нипах может протекать субклинически. Выявление антител к вирусу Хендра у лошадей не так важно в связи с высоким уровнем смертности в результате инфекции у данного вида животных. Случаи заражения вирусом Нипах или

Хендра у людей, как правило, диагностировали ретроспективно серологическими методами. Обнаружение специфических антител к вирусу Хендра или Нипах у животного или человека имеет диагностическую значимость, учитывая низкую превалентность инфекции и обильные свидетельства передачи инфекции от животных человеку.

Род генипавирусов продолжает расширяться по мере обнаружения все новых вирусов. В моче летучих лисиц в Австралии был выделен кедровый вирус, но способность этого вируса передаваться другим видам животных и вызывать у них болезнь пока еще предстоит изучить (Marsh et al., 2012). С помощью методов ПЦР и секвенирования у диких животных также были обнаружены и другие вирусы, по своим характеристикам схожие с генипавирусами, однако, их пока не удалось выделить с использованием традиционных способов выделения вирусов (Wu et al., 2014).

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

*Таблица 1. Методы исследования для диагностики генипавирусов и их цель*

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции–надзор (не клинический)	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>						
<b>Выделение вируса</b>	+	+	-	+++		-
<b>ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени</b>	+	+	++	+++	++	-
<b>ИГХ</b>	-	-	-	++	-	-
<b>Непрямой МФА</b>	-	-	-	++	-	-
<b>Определение иммунного ответа<sup>2</sup></b>						
<b>ИФА</b>	+++	+++	+++	+	+++	+++
<b>РНВ</b>	+++	+++	+++	+	+++	+++
<b>Анализы с микросферами</b>	+++	+++	+++	+	+++	+++

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

<sup>1</sup> При исследовании образца рекомендуется использовать комбинацию методов идентификации агента.

<sup>2</sup> Достаточно проведения одного из указанных серологических тестов

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

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИГХ = иммуногистохимия; непрямой МФА = непрямой метод флуоресценции антител; ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; РНВ = реакция нейтрализации вируса.

## **1. Биологическая безопасность лабораторий**

Вирусы Хендра и Нипах представляют опасность для человека и вызывают высокий уровень смертности, при этом для лечения инфекции этими вирусами не существует ни вакцин, ни эффективных противовирусных препаратов (ВОЗ, 2014). Все лабораторные манипуляции с культурами живого вируса (включая серологические тесты, например, реакцию нейтрализации вируса (РНВ) с использованием живого вируса) или с потенциально инфицированными/контаминированными материалами, например, с тканями и пробами крови следует проводить при соблюдении мер биобезопасности и биозащиты соответствующего уровня, установленного по результатам анализа биорисков (см. Главу 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Руководство по управлению биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии). Безопасность лабораторных работников должна быть обеспечена принятыми стратегиями управления биологическими рисками. Лаборатории могут использовать различные стратегии управления биологическими рисками в зависимости от того, тестируют ли они пробы методами ПЦР или занимаются размножением патогенов.

Размножение вируса, в частности, можно осуществлять только при соблюдении обязательных и строгих условий, позволяющих предотвратить случайное инфицирование персонала лаборатории. Во время первичного выделения вируса из образцов от животных или лиц с подозрением на инфекцию, следует понимать и соответствующим образом отражать в процедурах, что развитие «парамиксовирус-подобного» цитопатогенного эффекта (ЦПЭ) в инфицированных культурах свидетельствует о повышенном уровне риска заражения. Руководства по биологической безопасности настаивают на соблюдении требований надлежащей лабораторной практики и использовании ламинарных боксов II класса и соответствующих средств индивидуальной защиты или же ламинарных боксов III класса. Для подтверждения принадлежности изолята к роду *Henipavirus* можно использовать методы ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа для обнаружения антигена вируса в клетках, зафиксированных ацетоном. При передаче культур в специализированные лаборатории необходимо соблюдать правила транспортировки, указанные в Главе 1.1.3 Транспортировка образцов животного происхождения.

## **2. Идентификация возбудителя**

### **2.1. Выделение вируса и его характеристика**

Выделение вируса является одной из важных составляющих процедуры идентификации, и этот метод следует обязательно использовать для постановки окончательного диагноза, но при условии обеспечения безопасности лица, осуществляющего манипуляции. Выделение вируса особенно важно при обнаружении новых случаев или вспышек в тех регионах, где ранее не регистрировали инфекции вирусом Хендра или Нипах. Молекулярные методы обнаружения агента, не требующие работы с живым вирусом, подходят для выявления генома вируса в образцах. При возникновении подозрения, что какой-то

вид животного является естественным хозяином вирусов, необходимо проверить его серологическими методами, методами ПЦР или выделения вируса у отловленных диких животных (Daniels et al., 2007).

### **2.1.1. Отбор проб и отправка в лабораторию**

Ткани, из которых был выделен вирус в случаях естественного и экспериментального заражения, описаны у Daniels et al., 2000. У живых животных берут смывы (назальные или ороназальные) и пробы сыворотки. Полезными также могут быть пробы мочи, образцы головного мозга, легких, почек и селезенки, которые можно отбирать с соблюдением мер биобезопасности. Образцы транспортируют при температуре 4°C, если доставка в лабораторию занимает не более 48 часов; если время транспортировки может составить более 48 часов, образцы следует отправлять в замороженном виде на сухом льду или в парах жидкого азота ( $\approx -78,5^\circ\text{C}$ ). Образцы нельзя хранить при температуре  $-20^\circ\text{C}$ .

Диагностические образцы направляют в специализированные лаборатории в специально предназначенных для этого контейнерах в соответствии с требованиями, указанными в Главе 1.1.3.

### **2.1.2. Выделение в культурах клеток**

При выделении генипавируса важнейшим аспектом является обеспечение условий биобезопасности, как описано в Разделе 1 выше.

Выделению вируса способствует тот факт, что вирус Хендра и вирус Нипах быстро растут до высоких титров во многих культурах клеток. Особенно чувствительными считаются клетки почек зеленой африканской мартышки (Vero) и клетки почки кроликов (RK-13). Вирус Хендра также способен реплицироваться в головном мозге мышат-сосунов и в эмбрионах кур, о чем должны быть осведомлены лаборатории, использующие данные системы выделения при изучении недиагностированных инфекций.

В ходе выделения вируса работа с тканями должна осуществляться в стерильных условиях. 10% суспензии (в отношении массы к объему) тканей получают посредством размалывания тканей в закрытом гомогенизаторе. Все процессы следует проводить в ламинарном боксе III класса или в ламинарном боксе II класса с одновременным использованием средств индивидуальной защиты. Пробирки должны быть оснащены крышкой с уплотнительным кольцом и наружной резьбой. После очистки гомогената центрифугированием в роторе с защитной крышкой при 300 g и 4°C супернатант вносят в конфлюэнтные клеточные монослои.

ЦПЭ обычно развивается в течение 3 дней, тем не менее, образец объявляют отрицательным только по прошествии пяти дней. После пассирования с низкой множественностью ЦПЭ характеризуется образованием синцития, охватывающего спустя 24-48 часов 60 или более ядер. Площадь синцития, образуемого вирусом Нипах в монослоях клеточных линий Vero, существенно превышает таковую, образуемую вирусом Хендра в течение того же периода времени. Хотя в начале инфекции распределение ядер в синцитии,

индуцированном вирусом Нипах, практически не отличается от такового в случае с вирусом Хендра – скопление ядер наблюдается ближе к центру синцития, ядра в зрелом синцитии, образованном вирусом Нипах, распределяются вокруг внешней поверхности гигантской клетки.

### 2.1.3. Методы идентификации

#### i) Иммуноокрашивание зафиксированных клеток

Скорость, с которой реплицируются вирус Нипах и вирус Хендра, приводя к накоплению высоких концентраций антигена вируса в инфицированных клетках, делает реакцию иммунофлуоресценции полезным методом для быстрого обнаружения присутствия генипавирусов с использованием антисыворотки против вируса Нипах или Хендра. Перекрестная реактивность между вирусами Хендра и Нипах в серологических тестах означает, что тесты с использованием поликлональной антисыворотки против одного из вирусов или моноспецифической антисыворотки к отдельным белкам одного из вирусов не смогут различить вирус Хендра от вируса Нипах.

#### а) Процедура тестирования

В лабораторных условиях, обеспечивающих соответствующий контроль биологических рисков, монослои клеточных линий Vero или клеток RK-13, выращенные на стеклянных покровных стеклах или в слайд-камерах, заражают выделенным вирусом. Монослой просматривают на предмет присутствия синцития после инкубирования в течение 24-48 часов при 37°C. Рекомендуется тестировать несколько разведений вируса (в неразведенном виде, 1/10, 1/100), так как синцитий лучше наблюдать после заражения с низкой множественностью. Как только синцитий станет виден, инфицированные клетки фиксируют путем полного погружения в сосуд с ацетоном. Сосуд герметично запечатывают, и его поверхность стерилизуют до переноса в атмосферу лаборатории, где покровные стекла с инактивированным вирусом оставляют для высушивания на воздухе. Антиген вируса обнаруживают с использованием антисыворотки против вируса Нипах или вируса Хендра и стандартных процедур иммунофлуоресценции. Характерной чертой синцития, образованного генипавирусом, является наличие крупных многоугольных структур, содержащий флуоресцирующий антиген.

#### ii) Иммуно-электронная микроскопия

Присутствие высоких титров вирусов Хендра и Нипах в клетках *in vitro* позволяет визуализировать вирусы в культуральной среде методом электронной микроскопии с негативным контрастированием без предварительного центрифугирования с целью концентрирования клеток. Обнаружение взаимодействий вирус-антитело методом иммуноэлектронной микроскопии позволяет получить ценную

информацию о структуре вируса и реактивности антигена даже во время первичного выделения вируса. Другие ультраструктурные методы, такие как электронная микроскопия инфицированных вирусом клеток, выращенных на пленках-подложках (Nappa et al., 2006), а также идентификация реплицирующихся вирусов и телец включений в тонких срезах зафиксированных и залитых парафином культур клеток и инфицированных тканей способствуют постановке диагноза. Данные методы и их применение для обнаружения и анализа вирусов Хендра и Нипах подробно описаны Nyatt et al., 2001.

## **2.2. Идентификация вируса: дифференциация вирусов Нипах и Хендра**

### **2.2.1. Сравнительное иммуоокрашивание**

Для дальнейшей идентификации изолята генипавируса как вируса Хендра или Нипах задействуют методы сравнительного иммуоокрашивания, описанные в данном разделе. Изолят необходимо сравнить со стандартными культурами обоих вирусов, поэтому все процедуры следует проводить в лаборатории, обеспечивающей контроль биологических рисков. Контрольный и исследуемый вирусы титруют на монослоях клеточных линий Vero на 96-луночных планшетах, и через 18-24 часа очаги инфекции обнаруживают иммунологическими методами в клетках, зафиксированных ацетоном с использованием противовирусной сыворотки. Титр вируса выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ)/мл.

### **2.2.2. Реакция иммунофлуоресценции**

Изолят вируса, вступающий в реакцию с антисыворотками к вирусу Хендра и/или к вирусу Нипах в реакции иммунофлуоресценции, считают серологически идентичным вирусу Хендра или вирусу Нипах, если он демонстрирует такую же чувствительность к нейтрализации антисыворотками к вирусу Хендра и/или к вирусу Нипах, что и положительные контроли вируса Хендра или Нипах. Разведение антисыворотки к вирусу Хендра, нейтрализующее вирус Хендра, примерно в 4 раза превышает разведение той же антисыворотки, в такой же степени нейтрализующее вирус Нипах. И наоборот: антисыворотка к вирусу Нипах нейтрализует вирус Нипах в 4 раза более эффективно, чем вирус Хендра (Chua et al., 2000).

Недавно была разработана новая версия дифференцирующей реакции нейтрализации, позволяющей вместо инфекционного вируса использовать микросферы, связанные с эфрином B2 (Bossart et al., 2007). Хотя этот тест еще не прошел официальную валидацию, возможно, он станет одним из методов скрининга в лабораториях, в которых не обеспечены необходимые условия контроля биологических рисков при культивировании вирусов Хендра и Нипах.

### **2.2.3. Реакция нейтрализации на микропланшетах**

Возможность проведения данного метода зависит от наличия антисыворотки, специфичной к вирусам Хендра и Нипах, а также исходных вирусов.

Исходные вирусы Хендра и Нипх и неидентифицированный генипавирус разводят, а затем репликаты каждого вируса, содержащие примерно 100 ТЦД<sub>50</sub> в 50 мкл, вносят в лунки плоскодонного 96-луночного титрационного микропланшета. Вирусы смешивают с равным объемом минимальной эссенциальной среды Игла (ЕМЕМ) или с антисывороткой против вируса Нипах или вируса Хендра, разведенной в ЕМЕМ с различными факторами разведения. Полученные смеси инкубируют при 37°C в течение 45 минут, затем в каждую лунку вносят примерно  $2,4 \times 10^4$  клеток до получения конечного объема, равного приблизительно 200 мкл. После инкубирования при 37°C в течение 3 дней учитывают результаты теста с использованием инвертированного микроскопа, присваивая каждой лунке определенный балл в зависимости от степени наблюдаемого ЦПЭ. В лунках, в которых находятся только клетки или клетки и антисыворотка, ЦПЭ должен отсутствовать. В лунках, в которых находятся клетки и вирус, должен присутствовать синцитий и должно наблюдаться разрушение клеток. Положительной лункой считают ту, в которой все или часть клеток монослоя образуют крупный синцитий, характерный для генипавирусов.

### 3. Молекулярные методы – обнаружение нуклеиновой кислоты вируса

Полные геномы обоих вирусов секвенированы, и по мере выделения новых изолятов их последовательности архивируют в GenBank. Для обнаружения вируса широко применяют методы на основе ПЦР. Их преимущество – биологическая безопасность, так как они не требуют размножения живого инфекционного вируса, а также то, что они прошли валидацию в ряде лабораторий. Данные методы также отличаются высокой чувствительностью и специфичностью.

#### 3.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени)

Наиболее чувствительным и полезным методом обнаружения генома генипавируса в патологическом образце является ОТ-ПЦР в реальном времени (см. Таблицу 2). Методы исследования и используемые праймеры подбирают в зависимости от технического оснащения и химических реактивов, имеющихся в наличии в отдельных лабораториях (Mungall et al., 2006; Wacharapluesadee & Netchachudha, 2007). Тесты Taqman для детекции гена М (Smith et al., 2001) и гена N вируса Хендра (Feldman et al., 2009) это первичные средства диагностики болезни, вызываемой вирусом Хендра; то же верно и в отношении гена N вируса Нипах.

**Таблица 2.** Методы ОТ-ПЦР в реальном времени (Taqman) для детекции вирусов Нипах и Хендра

Анализ	Олиго нуклеотид	Название	Последовательность праймера (5'-3')	Метка зонда (5'-3')
HeV_TQM_M	Прямой праймер	HeV M 5755F	CTT-CGA-CAA-AGA-CGG-AAC-CAA	
	Обратный праймер	HeV M 5823R	CCA-GCT-CGT-CGG-ACA-AAA-TT	
	Зонд	HeV M 5778P	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	FAM-TAMRA

HeV_TQM_N	Прямой праймер	HeV N119F	GAT-ATI-TTT-GAM-GAG-GCG-GCT-AGT-T	
	Обратный праймер	HeV N260R	CCC-ATC-TCA-GTT-CTG-GGC-TAT-TAG	
	Зонд	HeV N198-220P	CTA-CTT-TGA-CTA-CTA-AGA-TAA-GA	FAM-MGBNFQ
NiV_TQM_N	Прямой праймер	NiV_N_1198F	TCA-GCA-GGA-AGG-CAA-GAG-AGT-AA	
	Обратный праймер	NiV_N_1297R	CCC-CTT-CAT-CGA-TAT-CTT-GAT-CA	
	Зонд	NiV_N_1247comp	CCT-CCA-ATG-AGC-ACA-CCT-CCT-GCA-G	FAM-TAMRA

### 3.2. Традиционная ОТ-ПЦР и секвенирование по Сенгеру

Для обнаружения вируса Хендра также можно воспользоваться одним из двух методов полугнездовой традиционной ПЦР, мишенью которых являются гены М и гена Р. Эти два анализа используют в качестве дополнительных тестов для подтверждения результатов анализов TaqMan, если в ходе последних были получены необычные/атипичные результаты. Вышеуказанные методы также используют для характеристики обнаруженных вирусов Хендра с помощью секвенирования по Сенгеру (ди-деокси) с применением тех же праймеров (см. Таблицу 3).

**Таблица 3.** Праймеры, используемые для традиционной ПЦР и секвенирования вируса Хендра

Целевой ген	Анализ	Тип праймера	Название	Последовательность праймера (5'-3')	ПЦР продукт
Ген М вируса Хендра	Первичная ПЦР	Прямой	HeV M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	300 п.н.
		Обратный	HeV M 5781R1	CCA-CTT-TGG-TTC-CGT-CTT-TG	
	Полугнездовая ПЦР	Прямой	HeV M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	211 п.н.
		Обратный	HeV M 5691R2	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	
Ген Р вируса Хендра	Первичная ПЦР	Прямой	HeV P 4464F1	CAG-GAG-GTG-GCC-AAT-ACA-GT	335 п.н.
		Обратный	HeV P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	
	Полугнездовая ПЦР	Прямой	HeV P 4594F2	TCA-ACC-ATT-CAT-AAA-CCG-TCA-G	205 п.н.
		Обратный	HeV P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	

#### 3.2.1. Условия ОТ-ПЦР для детекции вируса Хендра

##### i) Первичная ОТ-ПЦР

1 × 48°C в течение 30 минут, 94°C в течение 2 минут

40 × 95°C в течение 30 секунд, 53°C в течение 30 секунд, 68°C в течение 45 секунд

1 × 68°C в течение 7 минут

ii) Полугнездовая ПЦР

1 × 95°C в течение 5 минут

30 × 95°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 45 секунд

1 × 72°C в течение 7 минут

**Таблица 4. Праймеры, используемые для традиционной ПЦР и секвенирования вируса Нипах**

Ген М вируса Нипах	Первичная ОТ-ПЦР	Прямой праймер	NiV M 5659F	TGG-AAT-CTA-CAT- GAT-TCC-ACG-AAC- CAT-G	279 п.н.
		Обратный праймер	NiV M 5942R1	TAA-TGT-GGA-GAC- TTA-GTC-CGC-CTA-TG	
	Гнездовая ПЦР	Прямой праймер	NiV M 5659F	TGG-AAT-CTA-CAT- GAT-TCC-ACG-AAC- CAT-G	250 п.н.
		Обратный праймер	NiV M 5909R2	GTG-AAA-ACT-GCA- ATT-TCA-TCC-TAT-CAA- TC	

### 3.2.2. Условия ОТ-ПЦР для детекции вируса Нипах

i) Первичная ОТ-ПЦР

1 × 48°C в течение 30 минут

1 × 94°C в течение 2 минут

40 × 94°C в течение 30 секунд, 52°C в течение 30 секунд, 68°C в течение 45 секунд

1 × 68°C в течение 7 минут

ii) Полугнездовая ПЦР

1 × 95°C в течение 5 минут

30 × 95°C в течение 30 секунд, 52°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 45 секунд

1 × 72°C в течение 7 минут

Описано несколько традиционных методов ПЦР для детекции вируса Нипах, при этом мишенью большинства из них является ген N. Более подробную информацию можно получить в следующей публикации – Wacharapluesadee & Netchudra (2007). Полугнездовая ПЦР, нацеленная на ген L, описана Feldman et al., 2009.

Лаборатории, желающие применять молекулярные методы для обнаружения вирусов, могут воспользоваться опубликованными протоколами или проконсультироваться с Референтной лабораторией МЭБ.

### 3.3. Детекция антигена генипавируса в зафиксированных образцах тканей – иммуногистохимия

Иммуногистохимия – это очень эффективный инструмент, позволяющий визуализировать антиген вируса внутри клетки и тканевых структур. Нуклеопротеин вируса, представляющий собой его антиген, как правило, располагается внутри структурных микрочастиц разного размера и формы внутри цитоплазмы. Учитывая морфологический аспект интерпретации, возможна эффективная оценка специфичности цветового сигнала. Тест проводят на тканях, зафиксированных в формалине, что позволяет безопасно проводить процедуру без обеспечения условий микробиологической безопасности.

Антиген генипавируса реплицируется в нескольких типах клеток, включая эндотелий, гладкую мускулатуру сосудов, паренхиму легких, почечные клубочки, нервные клетки, в лимфоидную и соединительную ткань (Hooper et al., 2001; Marsh et al., 2011; Middleton et al., 2002; Mungall et al., 2002; Mungall et al., 2006). Плотность скопления антигена особенно высока в синцитии и в макрофагах внутри поражений, поэтому для диагностики генипавируса следует отбирать образцы таких тканей, как легкие, головной мозг, лимфоидные узлы, селезенка и почки. При отсутствии таких тканей следует исследовать любую ткань, так как антиген можно найти в любом кровеносном сосуде по всему сосудистому руслу. При отсутствии возможности ношения костюма химзащиты и выполнения соответствующих протоколов дезинфекции безопаснее будет взять небольшие кусочки ткани методом минимального вмешательства. Данный метод лучше всего подходит для забора тканей легких и подчелюстных лимфоузлов.

Кроличьи поликлональные антисыворотки против рекомбинантного нуклеопротеина генипавируса обеспечивают самую высокую надежность результатов исследования при использовании их в качестве первичных антител в диагностике методом иммуногистохимии. С целью диагностики также применяют метод обнаружения фосфопротеина, хотя экспрессия данного антигена, как правило, выражена в меньшей степени, чем экспрессия нуклеопротеина. На рынке также существуют различные системы вторичного обнаружения. Ниже представлен пример процедуры иммуногистохимии с использованием конъюгатов антител с пероксидазой хрена и хромогена АЕС (3-амино-9-этилкарбазол). Возможно применение и других методов с небольшими вариациями в процедуре в зависимости от используемых ферментов и хромогенов.

### **3.3.1. Процедура исследования**

- i) Зафиксированные ткани обрабатывают в соответствии со стандартными гистологическими процедурами и получают парафиновые блоки, тонкие срезы которых помещают на стеклянные предметные стекла. Таким же образом нарезают блоки с контрольными положительными и отрицательными образцами, если того требуют условия исследования.
- ii) Предметные стекла очищают от парафина путем погружения в три емкости с ксилолом каждый раз на три минуты. Срезы гидратируют в двух порциях 80-100% этанола, в одной порции 70% этанола и в водопроводной воде для удаления остаточного спирта.

- iii) Демаскировку антигена проводят путем нагревания срезов в цитратном буфере (pH 9) в течение 20 минут при 97°C или путем обработки протеинкиназой К в течение 5 минут.
- iv) На данном этапе и в промежутках между последовательными этапами до этапа vii стекла по несколько раз промывают в TRIS буфере (pH 7,6).
- v) На данном этапе выполняют блокировку эндогенного соединения в зависимости от используемой системы детекции. Например, в случае использования конъюгатов антител с пероксидазой хрена необходимо заблокировать эндогенную пероксидазу с помощью 3% водного раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 минут.
- vi) Вносят первичное антитело в предварительно указанном разведении на 45 минут.
- vii) Вносят конъюгат вторичных антител. Для этого существует множество систем: самая простая и надежная система состоит из одного этапа. С целью правильного применения необходимо свериться с руководством производителя препарата.
- viii) Вносят хромоген (например, 3-амино-9-этилкарбазол (АЕС) или диаминобензидин (DAB)) на 10 минут. С целью правильного применения необходимо свериться с руководством производителя препарата.
- ix) Промывают в дистиллированной воде для остановки формирования цвета.
- x) Выполняют контрастное окрашивание в гематоксилине в течение 30 секунд-3 минут (в зависимости от типа).
- xi) Промывают водопроводной водой. Вносят раствор Скотта (0,04 моль двууглекислого натрия, 0,3 моль сульфата магния) на 1 минуту и снова тщательно смывают водопроводной водой.
- xii) Стекла накрывают покровными стеклами с использованием водной заливочной среды.
- xiii) Антиген вируса будет виден в виде коричневого/красного пятна (цвет пятна зависит от использованного хромогена).

Все вышеуказанные методы исследования следует рассматривать исключительно в качестве руководства; каждый параметр исследования необходимо оптимизировать для каждой исследовательской лаборатории, поскольку в разных лабораторных условиях параметры теста могут отличаться.

## **2. Серологические тесты**

С целью снижения риска заражения персонала вирусом Хендра или Нипах в лабораториях, осуществляющих серологические исследования, особенно, во время вспышек применяют несколько стратегий: сыворотки подвергают облучению гамма-лучами (6 килогрей) или разводят 1/5 в фосфатно-буферном растворе (ФБР), содержащем 0,5% твин 20 и 0,5% Trigon-X100, и инактивируют нагреванием при 56°C в течение 30

минут. Выбор метода зависит от анализа риска. Считается, что образцы, отобранные для целей наблюдательных исследований или для тестирования с целью выдачи сертификата на перемещение животных, представляют меньшую опасность, чем образцы, отобранные с целью диагностики заболевания во время вспышки. В некоторых обстоятельствах инактивирование нагреванием можно использовать в качестве дополнительной меры предосторожности. Тем не менее, полезным было бы разработать единый подход для действия в любом случае, а не подбирать способ инактивации в каждом отдельном случае.

После введения вакцинации лошадей против вируса Хендра в Австралии диапазон целей исследований, направленных на обнаружение антител к гликопротеину, существенно изменился. Метод можно использовать для оценки иммунного ответа на вакцинацию, и выявление антител теперь не обязательно свидетельствует о перенесенной инфекции у животных, которым, возможно, была сделана прививка. При интерпретации результатов серологических тестов следует учитывать вероятность проведенной иммунизации.

### **2.1. Реакции нейтрализации вируса**

Реакция нейтрализации вируса (РНВ) (Kaku et al., 2009; Tamin et al., 2009) является эталонным стандартом. Чаще всего реакцию проводят на микропланшетах, что требует обеспечения условий, гарантирующих соответствующий уровень контроля биологических рисков. Исследуемые сыворотки инкубируют в присутствии вируса Хендра или вируса Нипах в лунках 96-луночного титрационного микропланшета перед внесением клеток Vero. Сыворотки исследуют в разведениях, начиная с разведения 1/2, хотя это может привести к проблемам с индуцируемой сывороткой цитотоксичностью. В случае с образцом плохого качества или небольшим объемом пробы, что часто бывает в случае с образцами, отобранными у летучей лисицы или у летучей мыши, первоначальным разведением может быть 1/5. Результаты культивирования учитывают на 3 день, положительными на присутствие антител считают те сыворотки, в которых наблюдается полная блокировка развития ЦПЭ. В случае если цитотоксичность может стать проблемой, рекомендуется применять подход, используемый в иммуноанализе бляшкообразования: снимать смеси вирус/сыворотка с монослоев клеток Vero сразу после этапа абсорбции, снижая, таким образом, их токсический эффект. Результаты РНВ считаются положительными, если нейтрализация вируса наблюдается хотя бы в одном разведении, используемом в тесте. При выявлении нейтрализующих антител к обоим вирусам (и к вирусу Хендра, и к вирусу Нипах), положительным считают более высокий титр антител – более чем в 4 раза превышающий таковой к другому вирусу. Если титры антител отличаются менее чем в 4 раза, исследуемую сыворотку считают положительной на неуточненный генипавирус.

### **2.2. Твердофазный иммуоферментный анализ**

Антигены генипавируса, полученные из культуры тканей и предназначенные для применения в твердофазном иммуоферментном анализе (ИФА), перед использованием облучают гамма-лучами в дозе 6 килогрей; данная обработка оказывает незначительный эффект на титр антигена. Для непрямого ИФА, разработанного для применения во время первой вспышки вируса Хендра в 1994 г., антиген получали из клеток, инфицированных вирусом Хендра, подвергнутых нескольким циклам замораживания и оттаивания с последующей обработкой 0,1%

(в отношении массы к объему) додецилсульфатом натрия. В последнее время с целью повышения эффективности в иммуноанализах на вирус Хендра используют растворимую форму рекомбинантного экспрессированного гликопротеина вируса Хендра (Bossart et al., 2005; McNabb et al., 2014).

В ходе национальной программы надзора в свиноводческих хозяйствах Малайзии в 1999 году (Daniels et al., 2000) использовали непрямой формат ИФА, в котором антиген получали в результате обработки клеток, инфицированных вирусом Нипах, неионным детергентом. Впоследствии, с целью контроля высокого уровня активности неспецифического связывания в некоторых сыворотках свиней был разработан модифицированный вариант ИФА на основе относительной реактивности сывороток с антигеном вируса Нипах и контрольного антигена, полученного из неинфицированных клеток Vero. В Центре по контролю заболеваемости, Атланта, США, применяли двойную стратегию: непрямой ИФА для обнаружения IgG и ИФА с захватом для обнаружения IgM. Для вируса Нипах также был разработан ИФА с использованием рекомбинантного нуклеокапсидного антигена (Yu et al., 2006) с возможностью конфигурации для обнаружения IgG или IgM.

Специфичность непрямого ИФА для вируса Нипах составляет 98,4% (Ong et al., 2000), что означает, что в ходе программ по надзору данный тест будет давать ложноположительные результаты. Возможно, это не станет существенной проблемой во время вспышки вируса Нипах, когда вирусом заражена большая часть поголовья свиней, и целью надзора является выявление неблагополучных хозяйств. Тем не менее, такой уровень специфичности создает проблемы при исследовании образцов, отобранных не во время вспышки, или если количество исследуемых проб ограничено. Если положительный результат ИФА свидетельствует о действительном наличии инфекции, не принятие соответствующих мер в данных обстоятельствах может привести к распространению вируса и смертельным случаям среди населения. И наоборот: принятие мер в результате получения ложноположительного результата в ИФА тесте было бы расточительством ресурсов (Daniels et al., 2001). Нынешний подход состоит в тестировании всех сывороток, положительных в ИФА, в реакции нейтрализации вируса, при этом все сыворотки, реагирующие в РНВ, будут считаться положительными на вирус Нипах. Подтверждающую РНВ проводят только при наличии условий, обеспечивающих безопасность при работе с живым вирусом, поэтому образцы, как правило, направляют в лабораторию, признанную на международном уровне и работающую по установленным методикам.

Ниже представлена процедура проведения ИФА для вируса Нипах, разработанная в Австралийской ветеринарно-санитарной лаборатории для исследования сывороток свиней и стандартизированная после совместных испытаний с Ветеринарным научно-исследовательским институтом в Ипок, Малайзия.

### **2.2.1. Процедура исследования**

По поводу подробного описания производства и/или поставки облученного антигена вируса Нипах и антигенов неинфицированных клеток Vero можно обратиться в Австралийскую ветеринарно-санитарную лабораторию.

- i) Подготовка исследуемых сывороток
- a) Подготовку проб крови перед центрифугированием осуществляют в ламинарном боксе II класса безопасности с применением средств индивидуальной защиты или в ламинарном боксе III класса безопасности.
  - b) Исследуемые сыворотки разводят 1/5 в ФБР, содержащем 0,5% (в объемном отношении) Triton X-100 и 0,5% (в объемном отношении) твин 20, в лунках 96-луночного титрационного микропланшета. Планшеты герметично запечатывают. Лабораторный персонал должен носить специальную одежду и перчатки, и перед выносом планшета из ламинарного бокса для нагревания при 56°C в течение 30 минут необходимо обработать руки и запечатанный планшет подходящим дезинфектантом (например, 1% Virkon).
  - c) 22,5 мкл сыворотки, инактивированной нагреванием, смешивают с равным объемом неинфицированных клеток Vero, разведенных 1/100 в ФБР, в качестве контрольного антигена. Тщательно перемешивают и инкубируют при 18-22°C в течение 30 минут.
  - d) Вносят 450 мкл блокирующего буфера (ФБР, содержащий 5% куриной сыворотки и 5% сухого обезжиренного молока) до получения конечного разведения сыворотки 1/100 и инкубируют при 18-22°C в течение 30 минут. Аликвоты сыворотки по 100 мкл вносят в две лунки, содержащие антиген вируса Нипах, и в две лунки, содержащие контрольный антиген в виде неинфицированных клеток Vero, описанные в этапе vi.
- ii) Процедура ИФА
- a) Контрольный антиген в виде неинфицированных клеток Vero и антиген вируса Нипах разводят в ФБР, чтобы обеспечить одновременную сенсibilизацию лунок с контрольным антигеном и антигеном вируса при равной концентрации белка. Антиген обычно разводят 1/1000 - 1/4000, хотя для конкретной серии антигена, как правило, устанавливают определенный фактор разведения. По 50 мкл антигена вируса и контрольного антигена вносят в лунки 96-луночного титрационного микропланшета следующим образом: антиген вируса в колонки 1, 3, 5, 7, 9 и 11, а контрольный антиген из клеток Vero – в колонки 2, 4, 6, 8, 10 и 12. Инкубируют при 37°C в течение 1 часа с встряхиванием. Допускается также инкубировать планшеты при 4°C в течение ночи.
  - b) ИФА планшеты промывают три раза ФБР, содержащем 0,05% твин 20, (250 мкл/лунка) и блокируют ФБР, содержащем 5% куриной сыворотки и 5% сухого обезжиренного молока, (100 мкл/лунка) в течение 30 минут при 37°C на шейкере.
  - c) Планшеты промывают трижды в ФБР, содержащем 0,05% твин 20, и вносят по 100 мкл инактивированной абсорбированной сыворотки

из этапа iii в каждую лунку, как показано в формате ниже. По 100 мкл ФБР, содержащего 5% куриной сыворотки и 5% сухого обезжиренного молока, вносят в лунки с конъюгатами и с контрольным субстратом. Планшеты инкубируют без встряхивания в течение 1 часа при 37°C и промывают трижды ФБР.

- d) Белок А/Г, конъюгированный с пероксидазой хрена, разводят в ФБР с добавлением 1% твин 20, содержащем 1% (в отношении массы к объему) сухого обезжиренного молока. Фактор разведения составляет примерно 1/50000. Хорошо перемешивают и добавляют по 100 мкл конъюгата белка А во все лунки кроме контрольных лунок с субстратом. Планшеты инкубируют в течение 1 часа при 37°C без встряхивания и промывают 4 раза ФБР с добавлением 0,05% твин 20.
- e) Субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ) готовят путем растворения одной таблетки (1 мг) в 10 мл 0,05 моль фосфатно-цитратного буфера, рН 5,0 и добавляют 2 мкл свежего 30% (в объемном отношении) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. По 100 мкл субстрата ТМБ вносят в каждую лунку. Инкубируют в течение 10 минут при 18-22°C, а затем останавливают реакцию добавлением по 100 мкл 1 моль серной кислоты в каждую лунку.
- f) Результаты теста учитывают после учета контрольных лунок с субстратом. Для расчета соотношения показателя оптической плотности (ОП) для каждой сыворотки (ОП антигена вируса Нипах/ОП контрольного антигена из клеток Vero) используют показатели ОП антигена вируса Нипах и контрольного антигена из клеток Vero при длине волны 450 нм.

### iii) Интерпретация результатов

Образцы с показателем ОП антигена вируса Нипах ниже 0,20 считают отрицательными. Образцы с показателем ОП антигена вируса Нипах выше 0,2 оценивают по соотношению ОП (антиген/контроль) в соответствии со следующими условиями:

- a) соотношение ОП более 2,0 – образец положительный
- b) соотношение ОП от 2,0 до 2,2 – образец сомнительный

Сомнительные и положительные сыворотки тестируют в реакции нейтрализации вируса.

## 2.3. Анализы с использованием микросфер

Возможно применение анализов с использованием микросфер. Ниже представлены примеры валидированных методов таких анализов<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Коммерческие реактивы указаны с целью содействия лабораториям, желающим использовать данный метод. Это не подразумевает одобрения МЭБ каких-либо определенных продуктов; возможно использование любых альтернативных валидированных препаратов.

Разработаны два мультиплексных серологических анализа с использованием магнитных микросфер (Luminex), позволяющих идентифицировать антитела к вирусу Хендра и к вирусу Нипах в одном тесте (Bossart et al., 2007; McNabb et al., 2014). Оба анализа имеют целью измерение уровня антител к растворимому рекомбинантному экспрессированному гликопротеину (sG) вирусов Хендра и Нипах. Один анализ позволяет измерить уровень антител, связывающихся непосредственно с sG (анализ связывания), а другой анализ оценивает способность антител блокировать связывание рецептора генипавируса эфрина В2 с sG (блокирующий анализ). Рекомбинантные белки вируса Хендра и Нипах сначала сцепляют с индивидуально идентифицируемыми магнитными микросферами. Эти микросферы затем смешивают с исследуемыми сыворотками. В ходе анализа связывания проводят обнаружение связанных антител с использованием биотинилированного белка А/Г и стрептавидин-фикоэритрина (S-PE). В ходе блокирующего анализа сыворотки должны конкурировать с биотинилированным рецептором эфрином В2 за связывание с sG, а для количественной оценки результатов используют S-PE. Затем микросферы считывают репортерным лазером анализатора Luminex, и результаты выражают в виде медианной интенсивности флуоресценции (MFI) на 100 микросфер. В данных анализах используют полностью рекомбинантные реактивы, поэтому их проведение не требует обеспечения условий биобезопасности, в то время как для традиционного ИФА необходимо обращать больше внимания на аспект контроля биологического риска, особенно, на этапе подготовки антигена. Как и в случае с ИФА, положительные результаты в тесте с использованием микросфер необходимо подтверждать в РНВ.

### 2.3.1. Процедура сцепления микросфер с белком

- i) Активация микросфер
  - a) Перед использованием буфер для активации микросфер (0,1 моль  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 6,2) доводят до комнатной температуры.  
Примечание: В виду тенденции к фотообесцвечиванию, не подвергайте микросферы воздействию света (пробирки следует накрывать фольгой).
  - b) Отбирают карбоксилированные микросферы MagPlex (Luminex согр., поставляется в форме  $1,25 \times 10^7$  микросфер/мл) для реакции связывания с белком (для вируса Хендра, обычно, берут микросферы №29, а для вируса Нипах – №30). Микросферы перемешивают на вортексе в течение 30 секунд при средней скорости, затем микросферы обрабатывают ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение ~30-60 секунд. Важно, чтобы микросферы были полностью восстановлены в виде отдельных монодисперсных частиц.
  - c) 300 мкл карбоксилированных микросфер MagPlex №29 и №30 ( $3,75 \times 10^6$  микросфер) переносят в пробирки Sarstedt объемом 2 мл. Пробирки помещают в магнитный сепаратор и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая пробирки с

магнитного сепаратора, с помощью пипетки снимают супернатант, стараясь не потревожить осадок из микросфер.

- d) Микросферы промывают путем добавления 300 мкл ФБР с добавлением твин 20 в пробирки с последующим перемешиванием на вортексе. Пробирки помещают в магнитный сепаратор и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая пробирки с магнитного сепаратора, с помощью пипетки снимают супернатант, стараясь не потревожить осадок из микросфер. Процедуру повторяют.
  - e) 600 мкл буфера для активации микросфер вносят в пробирки, затем содержимое пробирок перемешивают на вортексе. Пробирки помещают в магнитный сепаратор и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая пробирки с магнитного сепаратора, с помощью пипетки снимают супернатант, стараясь не потревожить осадок из микросфер. Процедуру повторяют.
  - f) 240 мкл буфера для активации микросфер вносят в пробирки, накрывают фольгой и встряхивают в течение 3 минут.
  - g) Раствор 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) (Pierce) и сульфо-N-гидроксисульфосукцинимид (S-NHS) (Pierce) в буфере для активации микросфер готовят непосредственно перед применением в концентрации 50 мг/мл (20 мкл буфера/мг порошка). 30 мкл свежеприготовленного раствора EDC (50 мг/мл) переносят в пробирки, затем сразу добавляют 30 мкл раствора S-NHS (50 мг/мл). Примечание: неиспользованные порции растворов выбрасывают, и каждый раз готовят свежий раствор.
  - h) Пробирки накрывают алюминиевой фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 20 минут.
  - i) Во время инкубирования пробирок готовят растворимые гликопротеины (sG). Для доведения объема белков до конечного объема 300 мкл используют по 90 мкг sG вируса Хендра и вируса Нипах и ФБР (не используйте ФБР с твин 20, так как он блокирует карбоксильные группы).
  - j) После инкубирования микросферы считаются активированными и готовыми для связывания. Пробирки помещают в магнитный сепаратор и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая пробирки с магнитного сепаратора, с помощью пипетки снимают супернатант, стараясь не потревожить осадок из микросфер.
- ii) Связывание с белком
- a) Микросферы промывают посредством внесения 300 мкл ФБР в пробирки с последующим встряхиванием на вортексе (не рекомендуется использовать ФБР с добавлением твин 20 ввиду того,

что данный раствор блокирует карбоксильные группы). Пробирки помещают в магнитный сепаратор и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая пробирки с магнитного сепаратора, с помощью пипетки снимают супернатант, стараясь не потревожить осадок из микросфер.

- b) К активированным микросферам добавляют 300 мкл подготовленного белка (описано выше).
- c) Пробирки накрывают алюминиевой фольгой и встряхивают на средней скорости при комнатной температуре в течение 2 часов.
- d) Теперь белок сцеплен с микросферами. Пробирки помещают в магнитный сепаратор и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая пробирки с магнитного сепаратора, с помощью пипетки снимают супернатант, стараясь не потревожить осадок из микросфер.
- e) Микросферы дважды промывают ФБР с добавлением твин 20 в объеме 300 мкл, как описано выше. Пробирки помещают в магнитный сепаратор и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая пробирки с магнитного сепаратора, с помощью пипетки снимают супернатант, стараясь не потревожить осадок из микросфер.
- f) Микросферы, сцепленные с белком, ресуспендируют в 1,8 мл буфера для хранения микросфер (10 мл ФБР, 1% альбумина бычьей сыворотки, 0,05% азида натрия и 1 таблетка ингибитора протеазы (Roche)) и хранят при 4°C.

**ПРИМЕЧАНИЯ:** Перед применением реактивность sG проверяют с использованием панели сывороток генипавируса. В лунки вносят по 1 мкл микросфер, связанных с белком, для анализа связывания и блокирующего анализа (данная процедура позволяет обеспечить достаточное количество связанных микросфер для исследования около 1800 сывороток). Микросферы, связанные с белком, можно хранить при 4°C в течение года без потери реактивности.

### **2.3.2. Процедура анализа связывания для идентификации генипавирусов на платформе Lumindex**

- i) Процедура исследования
  - a) Отбирают микросферы, уже сцепленные с sG вирусов Хендра и Нипах. Микросферы встряхивают на вортексе в течение 30 секунд на максимальной скорости, затем микросферы обрабатывают ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение ~30-60 секунд.
  - b) Микросферы разводят в блокирующем буфере (2% обезжиренного молока в ФБР с добавлением твин 20) в соответствующей концентрации для исследования определенного количества сывороток (1 мкл каждого набора микросфер на лунку).

- c) В соответствующие лунки 96-луночного плоскодонного микропланшета NUNC TC вносят по 100 мкл разведенных микросфер.
- d) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
- e) Планшет помещают в магнитный держатель и проводят сепарирование в течение 30-60 секунд. Не убирая планшет с магнитного держателя, содержимое сливают в раковину и осторожно промакивают бумажным полотенцем, затем планшет снимают с держателя.
- f) Дважды промывают ФБР с добавлением твин 20 или другим раствором с использованием автоматического устройства для отмывки планшетов.
- g) В лунки вносят по 100 мкл контрольной и исследуемой сывороток, разведенных 1/100 в ФБР с добавлением твин 20 (сыворотки летучих мышей разводят 1/50).

ПРИМЕЧАНИЕ: все сыворотки следует предварительно инактивировать при 56°C в течение 35 минут.

- h) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
- i) Планшет помещают в магнитный держатель и оставляют для сепарирования на 30-60 секунд. Не убирая планшет с магнитного держателя, содержимое сливают в раковину и осторожно промакивают бумажным полотенцем, затем планшет снимают с держателя.
- j) Дважды промывают ФБР с добавлением твин 20 или другим раствором с использованием автоматического устройства для отмывки планшетов.
- k) Разводят биотинилированный белок А (Pierce) 1/500 (2 мкг/мл) и биотинилированный белок G (Pierce) 1/250 (2 мкг/мл) в той же пробирке в ФБР с добавлением твин 20, и по 100 мкл данного раствора вносят в лунки.
- l) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
- m) Планшет помещают в магнитный держатель и оставляют для сепарирования на 30-60 секунд. Не убирая планшет с магнитного держателя, содержимое сливают в раковину и осторожно промакивают бумажным полотенцем, затем планшет снимают с держателя.

- p) Дважды промывают ФБР с добавлением твин 20 или другим раствором с использованием автоматического устройства для отмывки планшетов.
  - o) В лунки вносят по 100 мкл стрептавидина R-PE (QIAGEN), разведенного 1/1000 (1 мкг/мл) в ФБР с добавлением твин 20.
  - p) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
  - q) Результаты анализа учитывают на анализаторе Luminex с помощью соответствующего программного обеспечения.
- ii) Интерпретация результатов

Результаты можно интерпретировать по исходным показателям интенсивности микрофлуоресценции (MFI) или после конвертации исходных значений в процент относительно MFI для положительного контроля с помощью следующей формулы:

$$(\text{MFI исследуемой сыворотки} / \text{MFI положительного контроля}) \times 100$$

Образец, показатель MFI которого превышает 1000 или 5 в процентах от MFI положительного контроля, следует повторно исследовать в анализе связывания, а затем в блокирующем анализе. Если данный образец опять покажет положительный результат, его тестируют в РНВ для подтверждения.

### **2.3.3. Процедура блокирующего анализа для идентификации генипавирусов на платформе Luminex**

- i) Процедура исследования
  - a) Отбирают микросферы, уже сцепленные с sG вируса Хендра и Нипах. Микросферы встряхивают на вортексе в течение 30 секунд на максимальной скорости, затем микросферы обрабатывают ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение ~30-60 секунд.
  - b) Микросферы разводят в блокирующем буфере (2% обезжиренного молока в ФБР с добавлением твин 20) в соответствующей концентрации для исследования определенного количества сывороток (1 мкл каждого набора микросфер на лунку).
  - c) В соответствующие лунки 96-луночного плоскодонного микропланшета NUNC TC вносят по 100 мкл разведенных микросфер.
  - d) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
  - e) Планшет помещают в магнитный держатель и оставляют для сепарирования на 30-60 секунд. Не убирая планшет с магнитного держателя, содержимое сливают в раковину и осторожно

промакивают бумажным полотенцем, затем планшет снимают с держателя.

- f) Дважды промывают ФБР с добавлением твин 20 или другим раствором с использованием автоматического устройства для отмывки планшетов.
- g) В лунки вносят по 100 мкл контрольной и исследуемой сывороток, разведенных 1/50 в ФБР с добавлением твин 20 (сыворотки летучих мышей разводят 1/25).

ПРИМЕЧАНИЕ: все сыворотки следует предварительно инактивировать при 56°C в течение 35 минут.

- h) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
  - i) Планшет помещают в магнитный держатель и оставляют для сепарирования на 30-60 секунд. Не убирая планшет с магнитного держателя, содержимое сливают в раковину и осторожно промакивают бумажным полотенцем, затем планшет снимают с держателя.
  - j) Дважды промывают ФБР с добавлением твин 20 или другим раствором с использованием автоматического устройства для отмывки планшетов.
  - k) Разводят биотинилированный эфрин В2 (RnD Systems) 1/1000 (50 нг/мл) в ФБР с добавлением твин 20, и по 100 мкл данного раствора вносят в лунки.
  - l) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
  - m) Планшет помещают в магнитный держатель и оставляют для сепарирования на 30-60 секунд. Не убирая планшет с магнитного держателя, содержимое сливают в раковину и осторожно промакивают бумажным полотенцем, затем планшет снимают с держателя.
  - n) Дважды промывают ФБР с добавлением твин 20 или другим раствором с использованием автоматического устройства для отмывки планшетов.
  - o) В лунки вносят по 100 мкл стрептавидина R-PE (QIAGEN), разведенного 1/1000 (1 мкг/мл) в ФБР с добавлением твин 20.
  - p) Планшет накрывают фольгой и встряхивают при комнатной температуре в течение 30 минут на планшетном шейкере.
  - q) Результаты анализа учитывают на анализаторе Luminex с помощью соответствующего программного обеспечения.
- ii) Интерпретация результатов

Для блокирующего анализа исходные значения MFI конвертируют в процент ингибирования (%I) с помощью следующей формулы:  $(1 - [MFI \text{ исследуемой сыворотки} / MFI \text{ NSC}]) \times 100$

Образец, процент ингибирования которого превышает 15, следует сначала исследовать в анализе связывания, а затем повторно в блокирующем анализе. Если данный образец опять покажет положительный результат, его тестируют в РНВ для подтверждения.

## **2.4. Подход DIVA**

Теперь, когда существует вакцина против вируса Хендра для лошадей, желательным было бы иметь возможность дифференцировать вакцинированных лошадей от естественно инфицированных невакцинированных животных. Традиционно, подходы DIVA применяются в хозяйствах, в которых у вакцинированных животных будут присутствовать только антитела к белку(ам) вируса, на основе которого(ых) изготовлена вакцина (в случае вируса Хендра это гликопротеин), в то время как естественно инфицированные животные будут вырабатывать антитела ко всем белкам вируса, как к структурным, так и неструктурным. Однако такие результаты серологических тестов следует интерпретировать с осторожностью. Эксперименты на хорьках показали, что не у всех животных вырабатывается иммунный ответ на все белки вируса Хендра, которые можно обнаружить с использованием традиционных аналитических систем (Middleton D, неопубликованные данные), поэтому, серологические профили невакцинированных инфицированных животных иногда могут совпадать с таковыми у вакцинированных животных.

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ**

### **Ветеринарные вакцины против генипавирусов**

#### **1. Общая информация**

Первая вспышка вируса Нипах в Малайзии и Сингапуре была связана с передачей вируса от свиней человеку, и все случаи заражения людей вирусом Хендра в Австралии также были связаны с контактами с больными лошадьми. Разработка ветеринарных вакцин против генипавирусов является важной задачей как с точки зрения защиты восприимчивых видов домашних животных (свиней, лошадей, кошек и собак), так и с точки зрения снижения передачи вирусов от домашних животных людям. Эта необходимость и стала обоснованием для разработки вакцины против вируса Хендра, которая в настоящее время применяется для лошадей в Австралии.

#### **2. Вакцины на основе растворимого гликопротеина генипавируса**

Исследования с заражением вирусом Нипах кошек (Mungall et al., 2006) и мартышек (Bossart et al., 2012) и с заражением вирусом Хендра хорьков (Pallister et al., 2011) позволили получить убедительные доказательства того, что субъединичная вакцина на основе растворимого гликопротеина вируса Хендра способна не только предотвращать болезнь, но и обеспечивать защиту животных от заражения летальными дозами вируса Нипах и Хендра. Вакцина для лошадей изготовлена с использованием запатентованного

адьюванта (Zoetis). Экспрессированный на поверхности генипавируса гликопротеин G играет важную роль в инициации инфекции благодаря своей способности прикрепляться к рецепторам клеток хозяина, а антитела, направленные против этого белка, могут нейтрализовать вирус. Вакцина выпущена согласно разрешению на использование препарата, обеспечивающего незначительную экономическую выгоду, для применения у лошадей в Австралии в ноябре 2012 г., и может применяться только аккредитованными ветеринарами. При первичной иммунизации лошадям вводят две дозы вакцины с интервалом в 3 недели в возрасте 4 месяцев или старше. Для поддержания защитного эффекта производитель рекомендует проводить бустерные вакцинации каждые 6 месяцев.

### 3. Экспериментальные вакцины

В существующих в настоящее время экспериментальных вакцинах против вируса Нипах в качестве иммуногенов используются гликопротеин (G) и/или белок слияния (F) вируса Нипах. Вакцины разработаны на базе различных платформ, включая ДНК-вакцины, субъединичные вакцины, нереплицирующиеся векторы, а также реплицирующиеся векторы. Для обеспечения эффективности большинства экспериментальных вакцин необходим подход «прайм-буст», не предусматривающий применения биопрепаратов в условиях чрезвычайной ситуации во время вспышки. Проведена оценка живой аттенуированной векторной вакцины на основе рекомбинантных вирусов везикулярного стоматита (rVSV), экспрессирующих гликопротеины (G или F) или нуклеопротеин (N) вируса Нипах. В результате вакцинации сирийских хомячков одной дозой векторной вакцины на основе rVSV у животных наблюдалась выработка активного гуморального иммунного ответа, при этом нейтрализующая активность присутствовала только у тех животных, которые были вакцинированы векторными вакцинами на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, экспрессирующего только белки G и F вируса Нипах. Результаты эксперимента позволяют считать данные вакцины основными кандидатами на роль препаратов для вынужденной вакцинации во время вспышки вируса Нипах. Похожая векторная вакцина на основе репликативно-дефектного вируса везикулярного стоматита, экспрессирующего либо белок слияния (F), либо гликопротеинов прикрепления (G) вируса Нипах, введенная в однократной дозе хомячкам, обеспечивала защиту животных от заражения вирусом Нипах в дозе, в 1000 превышающей ЛД<sub>50</sub>.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BOSSART K.N., CRAMERI G., DIMITROV A.S., MUNGALL B.A., FENG Y.R., PATCH J.R., CHOUDHARY A., WANG L.F., EATON B.T. & BRODER C.C. (2005). Receptor binding, fusion inhibition, and induction of cross-reactive neutralizing antibodies by a soluble G glycoprotein of Hendra virus. *J. Virol.*, **79**, 6690–6702.
- BOSSART K.N., MCEACHERN J.A., HICKEY A.C., CHOUDHRY V., DIMITROV D.S., EATON B.T. & WANG L.F. (2007). Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems. *J. Virol. Methods*, **142**, 29–40.
- BOSSART K.N., ROCKX B., FELDMANN F., BRINING D., SCOTT D., LACASSE R., GEISBERT J.B., FENG Y.R., CHAN Y.P., HICKEY A.C., BRODER C.C., FELDMANN H. &

- GEISBERT T.W. (2012). A Hendra virus G glycoprotein subunit vaccine protects African green monkeys from Nipah virus challenge. *Sci. Transl. Med.*, **4** (146).
- CHING P.K.G., DE LOS REYES V.C., SUCALDITO M.N., TAYAG E., COLUMNAVINGNO A.B., MALBAS F.F., BOLO G.C., SEJVAR J.J., EAGLES D., PLAYFORD G., DUEGER E., KAKU Y., MORIKAWA S., KURODA M., MARSH G.A., MCCULLOUGH S. & AFOXWELL R. (2015). Outbreak of henipavirus infection, Philippines, 2014. *Emerg. Infect. Dis.*, **21**, 328–331.
- CHUA K.B., BELLINI W.J., ROTA P.A., HARCOURT B.H., TAMIN A., LAM S.K., KSIAZEK T.G., ROLLIN P.E., ZAKI S.R., SHIEH W.J., GOLDSMITH C.S., GUBLER D.J., ROEHRIG J.T., EATON B., GOULD A.R., OLSON J., FIELD H., DANIELS P., LING A.E., PETERS C.J., ANDERSON L.J. & MAHY B.W.J. (2000). Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, **288**, 1432–1435.
- CHUA K.B., KOH C.L., HOOI P.S., KONG, F.W., KHONG J.H., CHUA B.H., CHAN Y.P., LIM M.E. & LAM S.K. (2002). Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying foxes. *Microbes and Infection*, **4**, 145–151.
- DANIELS P., AZIZ J., KSIAZEK T.G., ONG B.L., BUNNING M.J.B., FIELD H., OLSON J., HOFFMAN D., BOLOU J. & OZAWA Y. (2000). Nipah virus – developing a regional approach. *In: Comprehensive Reports on Technical Items presented to the International Committee or Regional Commissions. OIE, Paris, France, 2207–2217.*
- DANIELS P., HALPIN K., HYATT A. & MIDDLETON D. (2007). Infection and disease in reservoir and spillover hosts: determinants of pathogen emergence. *Curr. Top. Immunol. Microbiol.*, **315**, 113–131.
- DANIELS P., KSIAZEK T. & EATON B.T. (2001). Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections. *Microbes Infect.*, **3**, 289–295.
- FELDMAN K.S., FOORD A., HEINE H.G., SMITH I.L., BOYD V., MARSH G.A., WOOD J.L.N., CUNNINGHAM A.A. & WANG L.F. (2009). Design and evaluation of consensus PCR assays for henipaviruses. *J. Virol. Methods*, **161**, 52–57.
- HALPIN K., YOUNG P.L., FIELD H.E. & MACKENZIE J.S. (2000). Isolation of Hendra virus from pterid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.*, **81**, 1927–1932.
- HANNA, J.N., MCBRIDE W.J., BROOKES D.L., SHIELD J., TAYLOR C.T., SMITH I.L., CRAIG S.B. & SMITH G.A. (2006). Hendra virus infection in a veterinarian. *MJA*, **185**, 562–564.
- HAYMAN D.T., SUU-IRE R., BREED A.C., MCEACHERN J.A., WANG L., WOOD J.L. & CUNNINGHAM A.A. (2008). Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS ONE*, **3**, e2739.
- HOOPER P., ZAKI S., DANIELS P. & MIDDLETON D. (2001). Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.*, **3**, 315–322.
- HYATT A.D., ZAKI S.R., GOLDSMITH C.S., WISE T.G. & HENGSTBERGER S.G. (2001). Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect.*, **3**, 297–306.

- IEHLE C., RAZAFITRIMO G., RAZAINIRINA J., ANDRIAHOLINIRINA N., GOODMAN S.M., FAURE C., GEORGES-CORBOT M-C., ROUSSET D. & REYNES J-M. (2007). Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropid bats, Madagascar. *Emerg. Infect Dis.*, **13**, 159–161.
- KAKU Y., NOGUCHI A., MARSH G.A., MCEACHERN J.A., OKUTANI A., HOTTA K., BAZARTSEREN B., FUKUSHI S., BRODER C.C., YAMADA A., INOUE S., WANG L.F. (2009). A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol. Methods*, **160**, 7–13.
- LUBY S.P., RAHMAN M., HOSSAIN M.J., BLUM L.S., HUSAIN M.M., GURLEY E., KHAN R., AHMED B.N., RAHMAN S., NAHAR N., KENAH E., COMER J.A. & KSIAZEK T.G. (2006). Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 1888–1894.
- MARSH G.A., HAINING J., HANCOCK T.J., ROBINSON R., FOORD A.J., BARR J.A., RIDDELL S., HEINE H.G., WHITE J.R., CRAMERI G., FIELD H.E., WANG L.F. & MIDDLETON D. (2011). Experimental infection of horses with Hendra virus/Australia/horse/2008/Redlands. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 2232–2238.
- MARSH G.A., DE JONG C., BARR J.A., TACHEDJIAN M., SMITH C., MIDDLETON D., YU M., TODD S., FOORD A.J., HARING V., PAYNE J., ROBINSON R., BROZ I., CRAMERI G., FIELD H.E. & WANG L.F. (2012). Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats. *PLoS Pathog*, **8**, e1002836.
- MCNABB L., BARR J., CRAMERI G., JUZVA S., RIDDELL S., COLLING A., BOYD V., BRODER C., WANG L.F. & LUNT R. (2014). Henipavirus microsphere immuno-assays for detection of antibodies against Hendra virus. *J. Virol. Methods*, **200**, 22–28.
- MIDDLETON D.J., WESTBURY H.A., MORRISSY C.J., VAN DER HEIDE B.M., RUSSELL G.M., BRAUN M.A. & HYATT A.D. (2002). Experimental Nipah virus infection in pigs and cats. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 124–136.
- MUNGALL B.A., MIDDLETON D., CRAMERI G., BINGHAM J., HALPIN K., RUSSELL G., GREEN D., MCEACHERN J., PRITCHARD L.I., EATON B.T., WANG L.F., BOSSART K.N. & BRODER C.C. (2006). Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J. Virol.*, **80**, 12293–12302.
- MURRAY K., SELLECK P., HOOPER P., HYATT A., GOULD A., GLEESON L., WESTBURY H., HILEY L., SELVEY L. & RODWELL B. (1995). A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science*, **268**, 94–97.
- NOR M.N.M., GAN C.H. & ONG B.L. (2000). Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 160–165.
- OLSON J.G., RUPPRECHT C., ROLLIN P.E., UNG S.A., NIEZGODA M., CLEMINS T., WALSTON J. & KSIAZEK T.G. (2002). Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus lylei*), Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 987–988.
- ONG B.L., DANIELS P.W., BUNNING M., AZIZ J., WHITE J., MUNIANDY M., OLSON J., CHANG K.W., MORRISSY C., LIM Y.S., KSIAZEK T. & NORDIN M.N. (2000). A surveillance program for the detection of pig herds exposed to Nipah virus infections in

peninsular Malaysia. *In: Proceedings of the 9th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE)*. Abstract ID 63. Colorado, USA.

PALLISTER J., MIDDLETON D., WANG L.F., KLEIN R., HAINING J., ROBINSON R., YAMADA M., WHITE J., PAYNE J., FENG Y.R., CHAN Y.P. & BRODER C.C. (2011). A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine*, **29**, 5623–56230.

PATON N.I., LEO Y.S., ZAKI S.R., AUCHUS A.P., LEE K.E., LING A.E., CHEW S.K., ANG B., ROLLIN P.E., UMAPATHI T., SNG I., LEE C.C., LIM E. & KSIAZEK T.G. (1999). Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet*, **354**, 1253–1256.

REYNES J., COUNOR D., ONG S., FAURE C., SENG V., MOLIA S., WALSTON J., GEORGES-COURBOT M.C., DEUBEL V. & SARTHOU J. (2005). Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1042–1047.

ROGERS R.J., DOUGLAS I.C., BALDOCK F.C., GLANVILLE R.J., SEPPANEN K.T., GLEESON L.J., SELLECK P.N. & DUNN K.J. (1996). Investigation of a second focus of equine morbillivirus infection in coastal Queensland. *Aust. Vet. J.*, **74**, 243–244.

SENDOW I., FIELD H.E., CURRAN J., DARMINTO, MORRISSY C.J., MEEHAN G., BUICK T. & DANIELS P.W. (2006). Henipavirus in *Pteropus vampyrus* bats, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 711–712.

SMITH I.L., HALPIN K., WARRILOW D. & SMITH G.A. (2001). Development of a fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for the detection of Hendra virus. *J. Virol. Methods*, **98**, 33–40.

SOHAYATI A.R., HASSAN L., EPSTEIN J.H., ZAINI C.M., AZIZI M.Y., SHARIFAH S.H., FIELD H.E., TOM H., JUSTIN W., NAIM S.N., ARSHAD S.S., AZIZ JAMALUDDIN A., DASZAK P. & HENIPAVIRUS ECOLOGY RESEARCH GROUP (2013). Risk factors for Nipah virus infections among pteropid bats, Peninsular Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.*, **1**, 51–60.

SOHAYATI A.R., HASSAN L., SHARIFAH S.H., LAZARUS K., ZAINI C.M., EPSTEIN J.H., SHAMSYUL NAIM N., FIELD H.E., ARSHAD S.S., ABDUL AZIZ J., DASZAK P. & HENIPAVIRUS ECOLOGY RESEARCH GROUP (2011). Evidence of Nipah virus recrudescence and serological pattern of captive *Pteropus vampyrus*. *Epidemiol. Infect.*, **10**, 1570–1579.

TAMIN A., HARCOURT B.H., LO M.K., ROTH J.A., WOLF M.C., LEE B., WEINGARTL H., AUDONNET J.C., BELLINI W.J. & ROTA P.A. (2009). Development of a neutralization assay for Nipah virus using pseudotype particles. *J. Virol. Methods*, **160**, 1–6.

WACHARAPLUESADEE S. & HEMACHUDHA T. (2007). Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *J. Virol. Methods*, **141**, 97–101.

WACHARAPLUESADEE S., LUMLERTDACHA B., BOONGIRD K., WANGHONGSA S., CHANHOME S., ROLLIN P., STOCKTON P., RUPPRECHT C.E., KSIAZEK T.G. & HEMACHUDHA T. (2005). Bat Nipah Virus, Thailand, *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1949–1951.

WILLIAMSON M.M., HOOPER P.T., SELLECK P.W., GLEESON L.J., DANIELS P.W., WESTBURY H.A. & MURRAY P.K. (1998). Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust. Vet. J.*, **76**, 813–818.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2004). Laboratory Biosafety Manual, Third Edition. WHO, Geneva, Switzerland.  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

WU Z., YANG L., YANG F., REN X., JIANG J., DONG J., SUN L., ZHU Y., ZHOU H. & JIN Q. (2014). Novel Henipa-like virus, Mojjiang Paramyxovirus, in rats, China, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1064–1066.

YU F., KHAIRULLAH N.S., INOUE S., BALASUBRAMANIAM V., BERENDAM S.J., TEH L.K., IBRAHIM N.S., ABDUL RAHMAN S., HASSAN S.S., HASEBE F., SINNIAN M. & MORITA K. (2006). Serodiagnosis using recombinant Nipah virus nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 3134–3138.

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