

ГЛАВА 3.1.10.

**ЯПОНСКИЙ ЭНЦЕФАЛИТ**

---

**РЕЗЮМЕ**

**Определение болезни:** Вирус японского энцефалита (ВЯЭ) является членом рода *Flavivirus* в семействе *Flaviviridae* и вызывает энцефалит, главным образом, у лошадей и людей. Вирус японского энцефалита также инфицирует свиней, у которых он является причиной абортос и мертворождения. Сохранение вируса японского энцефалита в природе обеспечивается комарами, свиньями и водоплавающими птицами. Основным вектором вируса японского энцефалита в большей части Азии является *Culex tritaeniorhynchus*, однако на местах и другие виды могут играть важную роль. Свиньи играют роль важных амплификаторов вируса, птицы также могут быть вовлечены в амплификацию и распространение вируса в окружающей среде. Болезнь наблюдается в больших регионах Африки, а в последнее время и в Западно-Тихоокеанском регионе. У лошадей инфицирование обычно происходит бессимптомно. У пораженных лошадей наблюдаются клинические признаки, которые включают повышенную температуру, депрессию, тремор мышц и нарушение координации движений. У свиней, при инфицировании супоросных свиноматок вирусом японского энцефалита в первый раз, могут наблюдаться аборты и мертворождение. У инфицированных супоросных свиноматок клинические признаки обычно не наблюдаются.

**Идентификация возбудителя:** Для процедуры выделения вируса производится отбор материала головного мозга от больных или павших лошадей с клиническими признаками энцефалита. Процедуры выделения вируса включают прививку мышей и инокуляцию клеточных культур. Суспензию тканей головного мозга вводят интрацеребрально 2-4 дневным мышам. Если у мышей в течение 14 дней наблюдаются признаки неврологического заболевания с последующей их гибелью, то затем можно проводить идентификацию вируса с использованием клеточной культуры. Выделение вируса можно также производить в первичных клеточных культурах, полученных из куриных эмбрионов, в клетках почки свиньи или хомяка и устойчивых клеточных линиях, таких как клетки почки африканской зеленой мартишки (*Vero*), клетки почки детеныша хомяка (*BHK-21*) или клетки комаров (*C6/36*). Результаты идентификации вируса, выделенного у мышей или из культур тканей, подтверждаются серологическими методами или методами обнаружения нуклеиновой кислоты, такими как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

**Серологические тесты:** Количественный анализ антител – полезный метод для определения превалентности инфекции в популяции лошадей, а также для диагностики японского энцефалита у больных людей. Методы количественного анализа включают реакцию нейтрализации вируса (РН), реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), реакцию связывания комплемента (РСК) и иммуноферментный анализ (ИФА). Наблюдается перекрестная реактивность с другими флавивирусами, такими как вирус Западного Нила, что может помешать точной диагностике. Наиболее специфическим методом является реакция нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования; данный метод можно использовать для дифференциации заражения вирусом японского энцефалита от инфекций другими флавивирусами. Ввиду наличия перекрестной

нейтрализации между членами серокомплекса японского энцефалита результаты серологические исследования должны включать параллельное тестирование родственных совместно циркулирующих флавивирусов.

**Требования к вакцинам:** В нескольких азиатских странах в настоящее время в продаже имеется два типа вакцин для людей и животных. Для лошадей используются инактивированные вакцины, полученные из инфицированного головного мозга мышей или на культуре клеток. Для свиней имеются инактивированные и живые аттенуированные вакцины.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Японский энцефалит (ЯЭ) – болезнь, вызываемая переносимым комарами флавивирусом, который порождает клинические признаки энцефалита у инфицированных людей и лошадей; данная болезнь может быть летальной (Fenner *et al.*, 1992; Hoke Jr & Gingrich, 1994). Однако заражение у людей и лошадей обычно приводит к развитию субклинической инфекции. Вирус японского энцефалита также является причиной нарушения репродуктивной функции у свиноматок, что приводит к абортam, мертворождению и мумификации плода, хотя обычно у инфицированных супоросных свиноматок клинические признаки отсутствуют, и инфекция не оказывает негативного влияния на будущие беременности (Williams *et al.*, 2012).

Сохранение вируса японского энцефалита в природе обеспечивается комарами, дикими птицами и свиньями. Свиньи играют роль важных амплификаторов вируса, в амплификацию и распространение вируса также могут быть вовлечены птицы. В большинстве частей Азии основным переносчиком вируса японского энцефалита является *Culex tritaeniorhynchus*. Другие кровососущие комары также играют роль переносчиков. Из-за низких титров и короткого периода вирусемии люди и лошади не передают вирусы жалящим комарам и считаются тупиковыми хозяевами. Вирус японского энцефалита широко распространен в странах восточной, юго-восточной и южной Азии, а в последнее время распространился по западной Индии и в Западном Тихоокеанском регионе, включая восточный Индонезийский архипелаг, Папуа Новую Гвинею и северную Австралию (Mackenzie, 2005).

Вирус японского энцефалита принадлежит к роду *Flavivirus* в семействе *Flaviviridae*. Вирус японского энцефалита входит в серокомплекс японского энцефалита вместе с несколькими важными зоонозными вирусами, которые включают вирус Западного Нила (см. Глава 2.1.24), вирус энцефалита Сент-Луис, вирус энцефалита долины Мюррей и вирус Kunjin. Был идентифицирован только один серотип вируса японского энцефалита, хотя были продемонстрированы антигенные и генетические различия между штаммами вируса японского энцефалита с помощью нескольких методов, включая реакции связывания комплемента, торможения гемагглютинации, нейтрализации с использованием моноклональных и поликлональных антител, (Ali & Igarashi 1997; Banerjee, 1986; Hale & Lee, 1954; Hasegawa *et al.*, 1994; Kimura-Kuroda & Yasui, 1986) и олигонуклеотидных фингерпринтов вирусной РНК (Banerjee & Ranadive, 1989; Hori *et al.*, 1986). Показано, что анализ оболочечного (E) гена является хорошим представителем филогенетического анализа вируса японского энцефалита. На данный момент на основании результатов филогенетического анализа E гена вируса было описано пять генотипов вируса японского энцефалита (Solomon *et al.*, 2003; Uchil & Sachidanandam, 2001; Williams *et al.*, 2000).

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Таблица 1. Имеющиеся методы тестирования для диагностики японского энцефалита и их цель**

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции перед перемещением	Способствует осуществлению политики искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельного животного или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>						
Выделение вируса	-	-	-	+++	-	-
Обнаружение антигена	+	+	+	+	+	-
ОТ-ПЦР в реальном времени	++	++	++	++	++	-
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
РТГА	++	+++	++	+++	+++	+++
РСК	+	+	+	+	+	+
ИФА	++	++	++	++	++	++
РВН (РНПВБО)	+	++	+	+++	++	++
нМФА	+	+	+	+	+	+

Пояснения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, достоверность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; - = не соответствует указанной цели; n/a- не применим.

Хотя не все из тестов, указанных как категория +++ или ++, прошли официальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что они широко применяются без получения сомнительных результатов делает их приемлемыми.

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; РТГА – реакция торможения гемагглютинации; РСК – реакция связывания комплемента; ИФА – иммуноферментный анализ; ВН-реакция вируснейтрализации; РНПВБО-реакция нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования; нМФА – непрямой метод флуоресцирующих антител.

Точная диагностика японского энцефалита у лошадей и в случаях нарушения репродуктивной функции у свиноматок зависит от выделения вируса-возбудителя или обнаружения вируса-возбудителя в образцах нервной ткани. Процент выделения вируса от больных и павших лошадей обычно очень низкий, что может быть обусловлено нестабильностью вируса в определенных условиях окружающей среды, а также наличием антител у инфицированных животных. Диагностированию способствуют клинические, серологические и патологические данные. Возможна также постановка диагноза посредством обнаружения специфических IgM и IgG антител в спинномозговой жидкости с помощью методов на основе иммуноферментного анализа (ИФА) (Burke *et al.*, 1982). С помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в головном мозгу инфицированных лошадей была обнаружена вирусная нуклеиновая кислота (Lian *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2005).

У лошадей образцы, отобранные для проведения процедуры выделения вируса или обнаружения вируса (нуклеиновой кислоты или антигена), представляют собой порции полосатого тела, кортикального слоя или таламуса головного мозга. Также используются образцы крови и спинного мозга. У плодов, мертворожденных и новорожденных от

<sup>1</sup> Рекомендуется использовать комбинацию методов идентификации при исследовании одного и того же клинического образца.

свиноматок вирус можно выделить из или обнаружить в головном мозгу, селезенке, печени или тканях плаценты. Все материалы сразу же после их отбора следует немедленно охлаждать в холодильнике или замораживать до  $-80^{\circ}\text{C}$ , если образцы следует хранить в течение более 48 часов. Все манипуляции в лаборатории с живыми культурами или потенциально инфицированными/контаминированными материалами необходимо производить, при соблюдении надлежащего уровня биобезопасности и защиты, определенного посредством анализа биорисков (см. Главу 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарт для управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и в виварии*) в целях предотвращения возникновения риска заражения человека. Заражение людей может происходить при прямом контакте инфекционного материала с поврежденной кожей или слизистыми, случайном парентеральном введении или аэрозольно. Диагностам, осуществляющим сбор проб, следует также соблюдать надлежащие меры предосторожности. Имеется вакцина для людей, и ветеринаров, и лабораторных работников, входящих в группу риска, следует вакцинировать.

## 1. Идентификация возбудителя

Образцы головного мозга и спинного мозга гомогенизируют до получения 10% суспензии в забуференном солевом растворе, pH 7,4, содержащем телячью сыворотку (2%) или бычий сывороточный альбумин (0,75%), стрептомицин (100 мкг/мл) и пенициллин (100 Е/мл). Телячья сыворотка не должна содержать антител к вирусу японского энцефалита. Данную суспензию центрифугируют при 1500 g в течение 15 минут, удаляют надосадочную жидкость для тестирования. Для процедуры выделения вируса в культуре клеток можно использовать первичные культуры куриного эмбриона, клетки почки африканской зеленой мартышки (Vero), клетки почки детеныша хомяка (ВНК) или С3/С6 линию клеток комаров (клонированная клеточная линия из *Aedes albopictus*). Гомогенаты образцов, таких как головной мозг и кровь, отобранных у животных с подозрением на инфекцию или инфицированных животных, инокулируют на культуры клеток. В отличие от клеток позвоночных вирус японского энцефалита обычно не индуцирует цитопатогенное действие (ЦПД) в С3/С6 клетках. Поэтому для подтверждения может потребоваться дополнительное культивирование в клетках позвоночных и/или обнаружение вирусного антигена или РНК. Можно также использовать моноклональные антитела, специфические для флавивируса и вируса японского энцефалита, для идентификации вируса в фиксированных инфицированных клеточных монослоях с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител (Lian *et al.*, 2002).

Для выделения вируса с использованием мышей 0,02 мл вводят интрацеребрально 2-4-дневным мышам. Привитые мыши находятся под клиническим наблюдением в течение 14 дней. У них может не наблюдаться явных клинических признаков, но будет ясно выражена анорексия в виде исчезновения белых млечных пятен на брюшной полости. Затем изменится цвет кожи с розоватого на темно-красный, и непосредственно перед гибелью наблюдаются конвульсии. Мышей с тяжелой формой болезни следует подвергать усыплению. Головной мозг умерших и подвергнутых усыплению мышей собирают и хранят при  $-80^{\circ}$  для подтверждения посредством ОТ-ПЦР или дальнейшего пассирования в головном мозге мышей или культуре клеток.

Обнаружение антигена в головном мозге инфицированных мышей можно производить с использованием экстрагированного с помощью сахаразы/ацетона антигена, полученного, как описано в Разделе В.2.b.1. Данный антиген проверяют на способность агглютинировать эритроциты (RBCs) однодневных цыплят или гусей при различных уровнях pH, от 6,0 до 7,0, с интервалом в pH равным 0,2, в соответствии с описанным методом (Clarke & Casals, 1958). Вкратце, готовят суспензии эритроцитов разведения 1/24 в разбавителе с различными показателями pH. Производят серийное разведение 25 мкл объемов экстрагированного антигена на 96-луночном планшете с лунками с U-образным

дном. Затем, в каждую лунку добавляют 25 мкл разведенных эритроцитов. Планшет инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 1 часа и производят считывание результатов гемагглютинации. Если антиген способен к гемагглютинации эритроцитов, его применяют в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием антисыворотки к вирусу японского энцефалита.

Для выявления РНК вируса японского энцефалита в клинических образцах, в клетках позвоночных демонстрирующих ЦПД, или головном мозгу инфицированных мышей можно использовать также ОТ-ПЦР с применением соответствующих праймеров, специфичных для вируса японского энцефалита (Chung *et al.*, 1996; Jan *et al.*, 2000; Lian *et al.*, 2002; Tanaka, 1993; Williams *et al.*, 2001). В последнее время сообщалось о новом методе обнаружения нуклеиновых кислот для выявления РНК вируса японского энцефалита - петлевой изотермальной амплификации с обратной транскрипцией (RT-LAMP) (Parida *et al.*, 2006). Для диагностики заболевания у людей описаны другие методы ОТ-ПЦР, хотя опубликованных данных по методам для обнаружения нуклеиновых кислот для применения в ветеринарии мало.

## 2. Серологические тесты

Серологические тесты полезны для определения превалентности инфекции в популяции животных, географического распространения вируса и степени выработки антител у вакцинированных лошадей. При использовании серологии для диагностики инфекции или болезни у домашних и диких животных следует помнить, что в эндемичных районах могло произойти предшествующее инфицирование данным вирусом. При тестировании лошадей и свиней, когда производится интерпретация результатов серологии, следует учитывать также статус по вакцинации. Материнские антитела также могут сохраняться у свиней до 8 месяцев. Количественный анализ антител – полезный метод для определения степени превалентности инфекции в популяции животных, а также для диагностирования японского энцефалита у больных лошадей или свиней. Методы анализа включают реакцию нейтрализации вируса (РН), реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), реакцию связывания комплемента (РСК) и иммуноферментный анализ (ИФА). Для постановки диагноза необходимо значительное повышение в титре антител в парных сыворотках, собранных во время острой фазы болезни и фазы реконвалесценции (например, четырехкратное повышение титра в реакции нейтрализации вируса). Также следует учитывать специфичность каждого серологического теста. Недавно была описана реакция латексной агглютинации для обнаружения антител к вирусу японского энцефалита у свиней (Xinglin *et al.*, 2002). Для дифференциации антител, индуцированных после естественного заражения, от антител, индуцированных инактивированными вакцинами, можно использовать ИФА для антител к неструктурному белку (NS1) вируса японского энцефалита.

В некоторых регионах мира однозначно диагностировать японский энцефалит можно только после проведения дополнительных тестов на наличие родственных вирусов. Например, в Австралии распространены вирус энцефалита долины Мюррей и вирус Nile-Kunjün; эти вирусы являются членами серокомплекса вируса японского энцефалита и антигенно близко родственны вирусу японского энцефалита. Наблюдаемое в последнее время расширение распространения вируса Западного Нила в Северной Америке, где, как было известно, эндемичным является вирус энцефалита Сент-Луиса, является дополнительной иллюстрацией хорошей приспособляемости флавивирусов к новой окружающей среде. Присутствие антител к таким другим флавивирусам может затруднять серологическую диагностику японского энцефалита. Во всех тестах наблюдается некоторая перекрестная реактивность с другими флавивирусами; наиболее специфичным тестом является реакция нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования, особенно если используется 90% пороговое значение нейтрализации.

## **2.1. Нейтрализация вируса (реакция нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования)**

### **2.1.1. Культура клеток**

Для размножения вирусов и для использования в реакции нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования рекомендуется использовать клетки Vero, полученные из африканской зеленой марышки (ATCC № CCL-81).

Клетки Vero культивируют в полной альфа-минимальной поддерживающей среде ( $\alpha$ -MEM) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS) и антибиотиков. Для приготовления клеток для реакции нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования в 24-луночном формате используется следующий протокол:

- i) Подтвердить, что клетки Vero находятся в log фазе (примерно  $2 \times 10^7$  клеток в  $175 \text{ см}^2$  сосуде) и их жизнеспособность превышает 95%.
- ii) Добавить  $1,0 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  клеток в каждую лунку планшета; клетки выдерживают при  $37^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$  инкубаторе в течение 2 или 3 дней.

Конфлюэнтный монослой клеток следует приготовить за 2-3 дня по проведения анализа, поскольку клеточный монослой играет крайне важную роль для образования бляшек и для оценки точных результатов.

### **2.1.2. Штамм вируса и размножение вируса**

Обычно для реакции нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования используется KV 1899 штамм или Nakayama штамм вируса японского энцефалита.

Условия для получения вируса должны быть стандартизированы с использованием соответствующей множественности заражения (MOI:  $10^{-2}$  до  $10^{-3}$ ).

### **2.1.3. Реагенты**

- i)  $\alpha$ -MEM с добавлением 2-5% фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков (100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Для реакции нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования, для роста клеток и вируса и для разведения образцов следует использовать низкую итоговую концентрацию фетальной бычьей сыворотки от 2 до 5%.
- ii) 4% исходный раствор агарозы (растворенной в дистиллированной воде). Для приготовления покровной среды для образования бляшек растворы агарозы обычно используются в итоговой концентрации 1-2%.
- iii) 0,1% раствор нейтрального красного. Для визуализации бляшки в покровную среду добавляют витальный краситель, такой как нейтральный красный. Нейтральный красный является цитотоксичным в высоких концентрациях и чувствительным к свету, поэтому рекомендуется использовать низкую концентрацию красителя. Растворить порошок нейтрального красного в дистиллированной воде в концентрации 0,1% (вес/объем) и после автоклавирования хранить данный раствор в светонепроницаемом контейнере при  $4^\circ\text{C}$  до использования.

### **2.1.4. Приготовление покровной среды**

Состав первой покровной среды:

Реагенты	Количество
$\alpha$ -МЕМ, содержащая антибиотики	14 мл
Фетальная бычья сыворотка (5% итоговая концентрация)	1 мл
4% исходный раствор агарозы	5 мл
Общий объем	20 л

Состав второй покровной среды:

Реагенты	Количество
$\alpha$ -МЕМ, содержащая антибиотики	12,8 мл
Фетальная бычья сыворотка (5% итоговая концентрация)	1 мл
4% исходный раствор агарозы	5 мл
0,1% раствор нейтрального красного	1,2 мл
Общий объем	20мл

Все количества и объемы даны для 24-луночного формата планшета. Соединение реагентов следует производить непосредственно перед использованием. Следует убедиться, что до добавления в лунки покровная среда выдерживается при 42°C.

### 2.1.5. Анализ вирусного бляшкообразования

Для получения точных измерений перед проведением реакции нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования следует определить соответствующую дозу вируса для контрольного заражения. Тогда посредством анализа вирусного бляшкообразования можно будет определить целевое количество бляшек.

Для вирусов, принадлежащих к *Flaviviridae*, для данного анализа в основном используется метод двойного нанесения покровной среды.

#### Процедура теста (24-луночный формат планшета)

- i) Приготовить клетки 90-100% конфлюэнтного монослоя в 24-луночном формате.
- ii) Приготовить 7-лог серийное разведение ( $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ ) осветленного исходного вируса японского энцефалита в полной  $\alpha$ -МЕМ. Для этого последовательно развести исходный вирусный материал в 1,8 мл среды в микропробирке.
- iii) После этикетирования планшетов удалить среду из каждой лунки и немедленно заменить 0,1 мл соответствующего разведения вируса. В качестве отрицательного контроля добавляют полную среду без вируса.
- iv) Инкубировать клетки с вирусом в течение одного часа при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе.
- v) После инкубации в течение 1 часа удалить среду, содержащую вирус, из лунок и заменить 0,5 мл агарозы, содержащей первую покровную среду.

- vi) Дать агарозному покровному слою затвердеть в течение 1 часа при комнатной температуре, и инкубировать планшеты, перевернув их вверх дном для минимизации конденсации воды в лунках, в 37°C инкубаторе в течение 48 часов, чтобы образовались вирусные бляшки.
- vii) В каждую лунку добавить 0,5 мл второй покровной среды, содержащей 0,1% нейтральный красный, и оставить для отверждения агарозного покровного слоя в течение 1 часа в светонепроницаемом инкубаторе.
- viii) Инкубировать планшеты, перевернув их вверх дном, в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C в течение 48 часов, чтобы произошло максимальное окрашивание клеток.
- ix) Произвести подсчет бляшек невооруженным глазом, и вычислить титр исходного вируса. Титр можно определить по следующей формуле.

Титр (бляшкообразующие единицы [БОЕ/мл]) = количество бляшек x фактор разведения x 1 мл инокулята в каждой лунке

### **2.1.6. Реакция нейтрализации с подавлением вирусного бляшкообразования со свиной антисывороткой к вирусу японского энцефалита**

#### **Процедура теста**

- i) Приготовить клетки 90-100% конфлюэнтного монослоя в 24-луночном формате.
- ii) Приготовить серийные двукратные или четырехкратные разведения тестируемых сывороток крови и положительных и отрицательных контрольных сывороток крови. Тестируемые сыворотки перед проведением анализа следует инактивировать нагреванием при 56°C в течение 30 минут. Все тестируемые сыворотки перед приготовлением двукратных разведений следует первоначально десятикратно развести полной  $\alpha$ -МЕМ.
- iii) Тестируемая группа, распределенная по типу сыворотки крови:
  - a) свиная сыворотка крови, отобранная у невакцинированных свиней;
  - b) свиная сыворотка крови, отобранная у вакцинированных свиней
  - c) иммуно-положительная свиная сыворотка крови против вируса японского энцефалита;
  - d) отрицательная сыворотка: фетальная бычья сыворотка или иммунно-отрицательная свиная сыворотка крови против вируса японского энцефалита.
- iv) Приготовить 200 БОЕ/0,1 мл разведения вируса. Следует с помощью анализа вирусного бляшкообразования предварительно определить дозу вирусных бляшек в разбавителе. Для сравнения следует также приготовить 20 БОЕ/0,1 мл разведения вируса (используется в качестве точки разделения вирусного титра).
- v) Добавить равный объем разведения сыворотки крови в разведенный исходный вирус для получения итоговой концентрации приблизительно в 100 БОЕ/0,2 мл. Для 20 БОЕ/0,1 мл разведения вируса итоговая концентрация исходного вируса будет 10 БОЕ/0,2 мл.

- vi) Инкубировать планшеты, содержащий смесь сыворотки крови и вируса, в течение 1 часа при 37°C. После инкубации перенести 0,1 мл смеси в клетку.
- vii) После инкубации в течение 1 часа удалить среду, содержащую вирус, из лунок и заменить 0,5 мл агарозы, содержащей первую покровную среду.
- viii) Дать агарозному покровному слою затвердеть в течение 1 часа при комнатной температуре, и инкубировать планшеты, перевернув их вверх дном для минимизации конденсации воды в лунках, в CO<sub>2</sub> инкубаторе 37°C в течение 48 часов, чтобы образовались вирусные бляшки.
- ix) В каждую лунку добавить 0,5 мл второй покровной среды, содержащей 0,1% нейтральный красный, и оставить для отвердевания агарозного покровного слоя в течение 1 часа в светонепроницаемом инкубаторе.
- x) Инкубировать планшеты, перевернув их вверх дном, в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C в течение 48 часов, чтобы произошло максимальное окрашивание клеток.
- xi) Произвести подсчет бляшек невооруженным глазом и вычислить титр исходного вируса.
- xii) Определить среднее количество бляшек в контрольных лунках без сыворотки крови и определить пороговое значение БОЕ при 50% и 90% уровнях подавления: 50% подавление = 0,5 х БОЕ/лунка (сыворотки крови нет) 90% подавление = 0,1 х БОЕ/лунка (сыворотки крови нет)
- xiii) Вычислить 50% и 90% конечную точку титрования для тестируемых сывороток крови, которая представляет собой разведение сыворотки крови наиболее близкое к уровню подавления релевантному среднему количеству бляшек в контрольных лунках без сыворотки крови.

## **2.2. Реакция торможения гемагглютинации**

Реакция торможения гемагглютинации широко используется для диагностики японского энцефалита, но в её ходе наблюдается перекрестная реактивность с другими флавивирусами. Для данного теста сыворотки необходимо сначала обработать ацетоном или каолином, затем адсорбировать с помощью гомотипических эритроцитов для удаления любых неспецифических гемагглютининов в тестируемых сыворотках. Используют эритроциты гусей или однодневных цыплят при оптимальном рН (см. таблицу ниже). Оптимальный уровень рН зависит от используемого штамма вируса японского энцефалита. Реакцию следует проводить с использованием обработанных сывороток и 8 единиц стандартного антигена, который имеется в продаже в некоторых странах.

### **2.2.1. Гемагглютинация (ГА)**

- i) Приготовление антигена вируса

#### **1. Экстрагирование сахарозой-ацетоном антигена из головного мозга инфицированных мышей-сосунов (SMB)**

- a) Гомогенизировать инфицированный головной мозг мышей-сосунов с использованием 4 объемов 8,5% сахарозы.
- b) Добавлять гомогенат по каплям в холодный ацетон, объем которого превышает объем гомогената в 20 раз.
- c) Центрифугировать (500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.
- d) Ресуспендировать осадок, используя тот же объем, что и объем холодного ацетона, который указан выше, и выдерживать на ледяной бане в течение 1 часа.
- e) Центрифугировать (500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.
- f) Объединить осадок с холодным ацетоном в одной пробирке.
- g) Центрифугировать (500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.
- h) Распределить осадок внутри пробирки и высушивать в вакууме в течение 1-2 часов.
- i) Растворить сухой осадок солевым раствором: 0,4 объема первоначального гомогената.
- j) Центрифугировать (8000 g в течение 1 часа, 4<sup>0</sup>C). Надосадочная жидкость готова к использованию.

## **2. Инфицированная жидкость *Aedes albopictus*, клон С6/36, линия клеток**

- a) Собрать инфицированную жидкость после инкубации инфицированных культур при 28°C в течение 1 недели.
- b) Центрифугировать (1000 g в течение 15 минут). Надосадочная жидкость готова к использованию.

## **ii) Приготовление эритроцитов гусей**

### **1. Растворы**

- a) Кислотно-цитратно-декстрозный (ACD)

11,26 г цитрата натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); 4,0 г лимонной кислоты ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); 11,0 г декстрозы ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ); дистиллированная вода до получения конечного объема в 500 мл. Автоклавировать при 10 фунтах (удельное давление– 1,7) в течение 10 минут.

- b) Декстрозно-желатиновый-вероналовый (DGV)

0,58 г веронала (барбитал); 0,60 г желатина; 0,38 г веронала натрия (барбитала натрия); 0,02 г (0,026 г)  $\text{CaCl}_2$  (для  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); 0,12 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 8,50 г  $\text{NaCl}$ ; 10,0 г декстрозы; дистиллированная вода до получения конечного объема в 1000

мл. Автоклавировать при 10 фунтах (удельное давление– 1,7) в течение 10 минут (раствор легче приготовить, если увеличить исходный объем в пять раз).

## **2. Сбор крови**

1,5 мл кислотного-цитратного-декстрозного раствора + 8,5 мл крови (0,5 мл кислотного-цитратного-декстрозного раствора + 2,8 мл крови).

## **3. Промывание (стерильное)**

- a) Суммарный объем крови + 2,5 объема декстрозно-желатинового-вероналового раствора. Центрифугировать (500 g в течение 15 минут), затем удалить надосадочную жидкость.
- b) Ресуспендировать осажденные эритроциты в трех объемах (суммарный объем крови) декстрозно-желатинового-вероналового раствора.
- c) Центрифугировать (500 g в течение 15 минут), затем удалить надосадочную жидкость. Повторить этапы 2 и 3 еще два раза (всего четыре цикла обработки материала на центрифуге).
- d) Поместить полученную суспензию эритроцитов во флакон с колпачком из алюминиевой фольги.

## **4. Корректировка концентрации эритроцитов**

- a) 0,2 мл суспензии эритроцитов + 7,8 мл 0,9% NaCl (разведение 1/40).
- b) Произвести считывание оптической плотности (ОП)<sub>490</sub> на спектрофотометре, используя 10 мм пробирку.
- c) Откорректировать исходные эритроциты таким образом, чтобы разведение 1/40 давало 0,450 ОП<sub>490</sub> (итоговый объем = первоначальный объем x ОП<sub>490</sub> абсорбции/0,450.)
- d) Хранить исходные эритроциты в холодильнике в течение не более 1 недели.
- e) Перед использованием осторожно ресуспендировать эритроциты и развести 1/24 в вирус-корректирующем разбавителе (VAD).

### **iii) Разведение антигена**

#### **1. Исходные растворы (следует хранить при 4°C)**

- a) 1,5 M NaCl

87,7 г NaCl и дистиллированная вода до получения конечного объема в 1000 мл.

- b) 0,5 M борная кислота

30,92 г H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> и горячая дистиллированная вода до получения конечного объема в 700 мл (растворить борную кислоту и охладить).

- c) 1N NaOH

40,0 г NaOH и дистиллированная вода до получения конечного объема в 1000 мл.

d) борнокислый солевой раствор, pH 9,0

80 мл 1,5М NaCl, 100 мл 0,5 М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 24 мл 1,0 N NaOH и дистиллированная вода до получения конечного объема в 1000 мл

e) 4% бычий альбумин

4 г фракции V бычьего альбумина (Armour), 90 мл борнокислого солевого раствора, pH 9,0, довести уровень pH до 9,0 с помощью 1 N NaOH и борнокислого солевого раствора, pH 9,0, до получения конечного объема в 1000 мл.

## 2. Разбавитель антигена

0,4% бычий альбумин/борнокислый солевой раствор (BABS): 10 мл 4% бычьего альбумина, pH 9,0, и 90 мл борнокислого солевого раствора, pH 9,0.

## 3. Серийное разведение

Двукратное серийное разведение антигена бычьим альбумином/борнокислым солевым раствором на титрационном микропланшете с лунками с U-образным дном.

iv) Добавление гусиных эритроцитов

## 1. Исходные растворы

1,5 М NaCl

0,5 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 70,99 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (для Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O: 179,08 г) и дистиллированная вода до получения конечного объема в 1000 мл.

1,0 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 138,01 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (для Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 156,01 г) и дистиллированная вода до получения конечного объема в 1000 мл.

## 2. Рабочий раствор: вирус-корректирующий разбавитель (VAD)

Вирус-корректирующий разбавитель (VAD) (pH)	1.5 М NaCl	0.5 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Добавить дистиллированной воды до получения конечного объема в 1000 мл
6,0	100	32	184	
6,2	100	62	160	
6,4	100	112	144	
6,6	100	160	120	
6,8	100	192	104	
7,0	100	240	80	

Показатели VAD не являются уровнем pH каждого VAD, но являются уровнем pH после того как каждый VAD смешивается с равным объемом BABS, pH 9,0.

### 3. Процедуры

- a) Один объем исходных эритроцитов гусей + 23 объема вирус-корректирующего разбавителя (разведение 1/24).
- b) Добавить 25 мкл разведенных эритроцитов в каждую лунку на титрационном микропланшете, содержащую разведенный антиген (25 мкл/ на лунку).
- c) Инкубировать при 37<sup>0</sup>С в течение 1 часа, затем произвести считывание результата.
  - ++ Полная агглютинация (равномерно тонкая пленка эритроцитов с последующей криватурой дна лунки)
  - + Частичная агглютинация (кольцо, ассоциированное с неровным и более тонким слоем)
  - ± Минимальная агглютинация (пуговка на тонком или прерывистом слое)
  - Негативная агглютинация (четко очерченная пуговка без пленки из эритроцитов)Конечная точка – последнее разведение (наивысшее разведение), при котором наблюдается либо ++, либо +.  
Титр: величина, обратная разведению в конечной точке.

#### 2.2.2. Подавление гемагглютинации

- i) Приготовление тестируемой сыворотки

##### 1. Сбор крови и сепарация сывороток

- a) Инкубировать образец крови при 37<sup>0</sup>С в течение 1 часа, а затем при 4<sup>0</sup>С в течение ночи. Если тест необходимо провести немедленно, инкубацию в течение ночи можно заменить инкубацией пробы в течение 2-3 часов при 37<sup>0</sup>С.
- b) Центрифугировать (2000 g в течение 15 минут) для отделения сыворотки от сгустка.
- c) Произвести термоинактивацию при 56<sup>0</sup>С в течение 30 минут.
- d) Хранить при -20<sup>0</sup>С, если не производится немедленное процессирование.

##### 2. Обработка 2-меркаптоэтанолом (этот этап осуществляется, если необходимо определить титры IgM антител)

- a) Поместить 50 мкл сыворотки в две маленькие тест пробирки.
- b) Добавить 150 мкл 0,13 М 2-меркаптоэтанола в забуференном фосфатом солевом растворе (ЗФР) в одну тест пробирку и 15 мкл ЗФР в другую пробирку.
- c) Инкубировать при 37<sup>0</sup>С в течение 1 часа, затем охладить на ледяной бане.

##### 3. Экстрагирование ацетоном

- a) Добавить 2,5 мл холодного ацетона в сыворотку в тест пробирке. Укупорить резиновыми пробками, хорошо перемешать и проводить экстракцию в течение 5 минут на ледяной бане.
- b) Центрифугировать холодным (1500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.

- c) Повторить этапы i и ii еще раз.
- d) Распределить осадок внутри пробирок и высушивать в вакууме при комнатной температуре в течение 1 часа.
- e) Добавить в каждую пробирку 0,5 мл борнокислого солевого раствора, pH 9,0. Укупорить резиновыми пробками. Растворять осадок в течение ночи при 4<sup>0</sup>С до получения 1/10 разведения сыворотки.

#### **4. Экстракция каолином в качестве альтернативы экстракции ацетоном**

- a) 25% отмытый кислотой каолин в борнокислом солевом растворе (BS), pH 9,0.
- b) 1 объем сыворотки + 4 объема борнокислого солевого раствора + 5 объемов 25% каолина.
- c) Экстрагировать при комнатной температуре в течение 20 минут при редком встряхивании.
- d) Центрифугировать (1000 g в течение 30 минут). Надосадочная жидкость представляет собой 1/10 разведение сыворотки.

#### **5. Адсорбция гусиными эритроцитами**

- a) К каждой обработанной сыворотке добавить 1/50 объема массы гусиных эритроцитов.
- b) Адсорбировать в течение 20 минут на ледяной бане.
- c) Центрифугировать (800 g в течение 10 минут). Надосадочная жидкость готова для проведения реакции торможения гемагглютинации (разведение 1/10).

### **ii) Реакция торможения гемагглютинации**

#### **1. Первичное титрование антигена по гемагглютинации**

Развести антиген до получения 8 единиц на 50 мкл (8 Е/50мкл).

#### **2. Серийное двукратное разведение тестируемых сывороток на титрационном микропланшете**

- a) Реакция сыворотка – антиген

Добавить 25 мкл разведенного антигена в каждую лунку, содержащую разведенную тестируемую сыворотку. Поместить оставшийся антиген в пустые лунки и инкубировать при 4<sup>0</sup>С в течение ночи.

#### **3. Вторичное титрование антигена по гемагглютинации**

- a) Серийно развести приготовленный антиген (8 единиц/50 мкл) двукратно по 25 мкл системе.

- b) Добавить 25 мкл бычьего альбумина/борнокислого солевого раствора (BABS) в каждую лунку для получения 50 мкл в одной лунке (50 мкл/лунку).

#### **4. Добавление гусиных эритроцитов**

- a) Развести исходный запас эритроцитов (1/24) в вирус-корректирующем разбавителе (VAD).
- b) Распределить по 50 мкл в каждую лунку, содержащую 50 мкл смеси сыворотка-антиген или антигена вторичной титрации.
- iii) Инкубировать при 37<sup>0</sup>С в течение 1 часа, затем произвести считывание результатов.

Сывороточный титр торможения гемагглютинации представляет собой величину, обратную наивысшему разведению тестируемой сыворотки, демонстрирующему полное торможение гемагглютинации.

#### **5. Интерпретация результатов**

Четырехкратная разница между титром сыворотки, отобранной в острой фазе болезни, и титром сыворотки, отобранной в фазе реконвалесценции, считается значительным увеличением или снижением и является диагностической для инфекции вирусом антигенно родственным вирусу, используемому в тесте.

### **2.3. Связывание комплемента**

Иногда для серологической диагностики используют реакцию связывания комплемента (РСК). Антиген для данного теста экстрагируют из головного мозга привитых мышей с помощью ацетона/эфира.

#### **2.3.1. Приготовление антигена**

- i) Извлечь и взвесить головной мозг привитых мертвых мышей.
- ii) Добавить к головному мозгу 20 объемов холодного ацетона, выдержать при – 20<sup>0</sup>С и гомогенизировать.
- iii) Центрифугировать суспензию при 5000 g в течение 5 минут при 4<sup>0</sup>С и удалить надосадочную жидкость.
- iv) Добавить к осадку такой же объем холодного ацетона, какой использовался в этапе ii и хорошо перемешать.
- v) Произвести экстракцию ацетоном, посредством выдерживания осадка при -20<sup>0</sup>С в течение 20 минут и повторить процедуру центрифугирования, описанную в этапе iii выше.
- vi) Повторить этапы iv и v.
- vii) Повторить этапы iv и v, но при этом использовать холодный ацетон/эфир (смесь в равных объемах)
- viii) Повторить этапы iv и v дважды, используя холодный эфир.

- ix) Удалить надосадочную жидкость аспиратором и распределить осадок по центрифужной пробирке.
- x) Высушивать в вакууме в течение 1-2 часов.
- xi) Растворить осадок в холодном солевом растворе (2 мл/г головного мозга) и выдерживать при 4<sup>0</sup>С в течение ночи.
- xii) Центрифугировать при 5000 g в течение 1 часа. Надосадочная жидкость представляет собой антиген.

### 2.3.2. Процедура теста

- i) Провести термоинактивацию тестируемых сывороток в разведении 1/4 в желатино-вероналовом буфере.
- ii) Произвести серийное разведение сывороток двукратно на 96-луночном титрационном микропланшете (25 мкл).
- iii) Добавить 25 мкл 4 единиц антигена и смешать посредством встряхивания.
- iv) Добавить 50 мкл 2 единиц комплемента (объединенная в пул свежая сыворотка морской свинки).
- v) Смешать посредством встряхивания и инкубировать при 4<sup>0</sup>С в течение 18 часов.
- vi) Оставить микропланшет при комнатной температуре на 15 минут.
- vii) Добавить в каждую лунку 25 мкл сенсibilизированных эритроцитов овец.
- viii) Смешать посредством встряхивания и инкубировать при 37<sup>0</sup>С в течение 30 минут, затем произвести считывание результата.
- ix) Наивысшее разведение тестируемой сыворотки, демонстрирующее отсутствие гемолиза, является титром сыворотки, определенным посредством реакции связывания комплемента. Значимым считается четырехкратное или более увеличение или снижение титра.

### 2.4. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для обнаружения антител к вирусу японского энцефалита у лошадей и свиней использовали различные форматы ИФА. Сообщалось об эпитоп-блокирующем ИФА с использованием моноклональных антител специфичных к вирусу японского энцефалита, который способен выявлять IgG у свиней (Pant *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2001) и у лошадей (Lam *et al.*, 2005), хотя антитела к близко родственным флавивирусам могут по-прежнему давать перекрестную реакцию. Описан ИФА с захватом IgM для тестирования свиных сывороток крови (Pant *et al.*, 2006). Был также описан непрямой ИФА для изучения превалентности антител к вирусу японского энцефалита у свиней (Yang Dongkun *et al.*, 2006). Эти анализы использовались для изучения серопревалентности и для диагностических исследований. Традиционные серологические методы не могут дифференцировать антитела, индуцированные естественным заражением, от антител, индуцированных вакцинацией. Для обнаружения антител, индуцированных естественным заражением, но не антител,

индуцированных инактивированными вакцинами, был разработан метод ИФА, который обнаруживает антитела против неструктурного 1 (NS 1) белка вируса японского энцефалита, который индуцируется только инфекцией (Konishi *et al.*, 2004).

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ**

### **ВВ: ДАННЫЙ РАЗДЕЛ БЫЛ ПРИНЯТ В 2010 г., И В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ СЧИТАЕТСЯ, ЧТО ЕГО НЕОБХОДИМО ПЕРЕСМОТРЕТЬ**

В нескольких азиатских странах в продаже имеются два типа вакцин для людей и животных. Для людей в течение многих лет используются инактивированные вакцины, получаемые из головного мозга инфицированных мышей. В 2009 г. в Японии была лицензирована инактивированная вакцина, полученная из культуры клеток Vero. В Китае, в основном, используется живая аттенуированная вакцина, получаемая в клеточных культурах (Китайская Народная Республика).

Вакцину против японского энцефалита у лошадей производят посредством инактивации формалином вирусной суспензии, полученной из головного мозга инфицированных мышей или из клеточных культур. Для свиней в Японии используются как инактивированная, так и живая аттенуированная вакцины, полученные из клеточных культур.

Руководство по производству ветеринарных вакцин изложено в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, изложенные в данной главе и в Главе 1.1.8. намеренно являются общими по своей природе и могут быть дополнены национальными или региональными регламентами.

## **1. Общая информация**

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

Инактивированные вакцины используются для защиты лошадей от энцефалита и возможной последующей гибели, вызываемых заражением вирусом японского энцефалита. У свиней для защиты беременных свиноматок от мертворождения применяются как инактивированные, так и живые аттенуированные вакцины.

## **2. Схема производства и минимальные требования для традиционных вакцин**

### **2.1. Характеристики посевного материала**

#### **2.1.1. Биологические характеристики**

В Японии для производства вакцины для людей используется штамм Beijing-1 вируса японского энцефалита. Для лошадей и свиней используются также другие штаммы вируса японского энцефалита. Штаммы вируса, используемые для инактивированных вакцин, должны быть летальными для мышей в возрасте 3 недель при внутрибрюшинном введении и должны быть способны к росту в первичной культуре почки свиньи или в восприимчивых клеточных линиях. Штамм вируса для живой аттенуированной вакцины должен быть летальным для мышей в возрасте 2 дней, при интрацеребральном введении, но не должен приводить к вирусемии при введении поросятам в возрасте 1 месяца и не должен инфицировать плоды при введении супоросным свиноматкам в течение первого месяца беременности. Вирусы должны иметь

способность к гемагглютинации эритроцитов гусей, однодневных цыплят или голубей. Вирусы должны поддаваться нейтрализации стандартной антисывороткой к вирусу японского энцефалита.

### **2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от чужеродных возбудителей)**

Посевной вирус не должен содержать контаминирующие бактерии, грибы, микоплазмы или вирусы. Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации изложены в Главе 1.1.9.

## **2.2. Метод производства**

### **2.2.1. Процедура**

Вирус выращивают в головном мозге 3-4-недельных мышей или в монослойных культурах. Культуры следует протестировать в целях подтверждения того, что они не содержат случайно занесенных возбудителей (см. Главу 1.1.9.). Посевной вирус вводят интрацеребрально мышам. Отбирают головной мозг тех мышей, у которых наблюдаются ярко выраженные клинические признаки энцефалита. Данный головной мозг гомогенизируют в ЗФР, центрифугируют при 1500 *g* в течение 30 минут, а процессинг надосадочной жидкости производят как вирусной суспензии.

Посевной вирус инокулируют в клеточные культуры, а позже, когда уровень репликации вируса находится на максимуме, производят отбор жидкости отдельно для каждой партии. Данную жидкость фильтруют или центрифугируют при 1500 *g* в течение 30 минут, а процессинг надосадочной жидкости производят как вирусной суспензии.

Для инактивированных вакцин в суспензию добавляют формалин (0,5%) для инактивации любого живого вируса; она считается «неразведенной вирусной суспензией». Для повышения её иммуногенности можно добавлять адьювант.

Количество пассажей не должно превышать три, начиная с исходного вируса и двух, начиная с посевного вируса. Рекомендуется хранить исходный и посевной вирусы при температуре ниже  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже  $5^{\circ}\text{C}$  после лиофилизации.

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

Первичные клеточные культуры для производства вакцины необходимо получать от здоровых животных. Первичные клетки и линии клеток необходимо тестировать на наличие чужеродных бактерий, грибов, микоплазм и вирусов и свободу от них. Культуральные среды, фетальную бычью сыворотку и добавки необходимо тестировать с целью подтверждения их стерильности.

### **2.2.3. Контроль в процессе производства**

Суспензию вируса следует исследовать на наличие бактериальной и грибковой контаминации с помощью методов культивирования и на наличие вирусной инфекционности посредством интрацеребрального введения мышам или инокуляции в культуры клеток. Инактивированную неразведенную вирусную суспензию следует повторно исследовать на наличие контаминации

посредством культивирования в клетках и посредством микроскопии после окрашивания, их следует проверять посредством интрацеребрального введения мышам, чтобы гарантировать полную инактивацию вируса формалином.

## **2.3. Стерильность**

### **2.3.1. Тесты, проводимые на партии конечного продукта**

Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно найти в Главе 1.1.9.

Для тестирования конечного продукта на отсутствие активности десять мышей в возрасте 3 недель прививают интрацеребрально 0,03 мл продукта и осуществляют за ними ежедневное наблюдение. Все тестируемые мыши после окончания периода наблюдения продолжительностью 14 дней должны остаться в живых и не иметь энцефалита, что гарантирует полную инактивацию живого вируса.

Конечный продукт инаktivированной или аттенуированной вакцины необходимо протестировать на иммуногенность.

*Инаktivированная вакцина.* Продукт разводят 1/10 в ЗФР. Тридцать мышей в возрасте 2-3 недель прививают внутрибрюшинно 0,1 мл разведенного продукта дважды с интервалом в 3 дня. Должна быть эквивалентная непривитая контрольная группа. Десять мышей из каждой группы контрольно заражают внутрибрюшинно десятикратными разведениями (1/10, 1/100 и 1/1000) соответствующего вируса, такого как штамм Nakayama через 8 дней после первой прививки и наблюдают за ними в течение 14 дней. Уровень выживаемости должен составлять более 40% в иммунизированной группе, а смертность в контрольной группе должна быть более 90%. Титр вируса для контрольного заражения не должен быть менее  $10^3 LD_{50}$  (50% летальная доза) на 0,2 мл.

## **2.4. Требования для получения разрешения**

### **2.4.1. Требования к безопасности**

Живые аттенуированные вакцины не должны демонстрировать вирусемию, при их введении поросятам в возрасте 1 месяца и не должны инфицировать плоды при их введении супоросным свиноматкам в течение первого месяца беременности. Для инаktivированных вакцин, десять 3-недельных мышей прививают интрацеребрально 0,03 мл продукта, по истечении 14 дней не должны наблюдаться случаи гибели.

### **2.4.2 Требования к эффективности**

Поскольку сохранение вируса обеспечивается переносчиками, комарами, свиньями и дикими птицами, контроль и искоренение вируса японского энцефалита посредством применения вакцин затруднены. Вакцины используются для защиты лошадей от энцефалита и супоросных свиноматок от мертворождения.

### **2.4.3. Стабильность**

Необходимо продемонстрировать, что конечный продукт сохраняет полную эффективность в течение 12 месяцев при хранении при 4<sup>0</sup>С.

### 3. Вакцины, полученные с помощью биотехнологии

В настоящее время вакцин, полученных с помощью биотехнологии, нет.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ALI A. & IGARASHI A. (1997). Antigenic and genetic variations among Japanese encephalitis virus strains belonging to genotype 1. *Microbiol. Immunol.*, **41**, 241–252.

BANERJEE K. (1986). Certain characteristics of Japanese encephalitis virus strains by neutralization test. *Indian J. Med. Res.*, **83**, 243–250.

BANERJEE K. & RANADIVE S. N. (1989). Oligonucleotide fingerprint analysis of Japanese encephalitis virus strains of different geographical origin. *Indian J. Med. Res.*, **89**, 201–216.

BURKE D.S., HISALAK A. & USSERY M.A. (1982). Japanese encephalitis. *In: Proceedings of International Seminar on Viral Diseases in SE Asia and the Western Pacific*, Mackenzie J.S., ed. Academic Press, Sydney, Australia, 537–540.

CHUNG Y.J., NAM J.H., BAN S.J. & CHO H.W. (1996). Antigenic and genetic analysis of Japanese encephalitis viruses isolated from Korea. *Am. J. Trop. Me. Hyg.*, **55**, 91–97.

CLARKE D.H. & CASALS I. (1958). Techniques for haemagglutination with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.

FENNER F.J., GIBBS E.P.J., MURPHY F.A., ROTT R., STUDDERT M.J. & WHITE D.O. (1992). Flaviviridae. *In: Veterinary Virology, Second Edition*. Academic Press, New York, USA, 441–455.

HALE J. H. & LEE L.H. (1954). A serological investigation of six encephalitis viruses isolated in Malaya. *Br. J. Exp. Pathol.*, **35**, 426–433.

HASEGAWA H., YOSHIDA M., FUJITA S. & KOBAYASHI Y. (1994). Comparison of structural proteins among antigenically different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*, **12**, 841–844.

HOKE C.H. JR & GINGRICH J.B. (1994). Japanese encephalitis. *In: Handbook of Zoonoses, Second Edition*, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 59–69.

HORI H., MORITA K. & IGARASHI A. (1986). Oligonucleotide fingerprint analysis on Japanese encephalitis virus strains isolated in Japan and Thailand. *Acta Virol.*, **30**, 353–359.

JAN L.R., YUEH Y.Y., WU Y.C., HORNG C.B., & WANG G.R. (2000). Genetic variation of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Am. J. Trop. Me. Hyg.*, **62**, 446–452.

KIMURA-KURODA J. & YASUI K. (1986). Antigenic comparison of envelop protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **67**, 2663–2672.

KONISHI E., SHODA M, AJIRO N & KONDO T. (2004). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus

- nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5087–5093.
- LAM K.H.K., ELLIS T.M., WILLIAMS D.T., LUNT R.A., DANIELS P.W., WATKINS K.L. & RIGGS C.M. (2005). Japanese encephalitis in a racing thoroughbred gelding in Hong Kong. *Vet Rec.*, **157** (6), 168
- LIAN W.C., LIAU M.Y. & MAO C.L. (2002). Diagnosis and genetic analysis of Japanese encephalitis virus infected in horses. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **49**, 361–365.
- MACKENZIE J.S. WILLIAMS D.T. & SMITH D.W. (2007). Japanese encephalitis virus: the geographical distribution, incidence and spread of a virus with a propensity to emerge in new areas. *In: Perspectives in medical virology: emerging viruses in human populations*, Tabor E., ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 201-268.
- PANT G.R., LUNT R.A., ROOTES C.L. & DANIELS P.W. (2006). Serological evidence of Japanese encephalitis and West Nile viruses in domestic animals of Nepal. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **29** (2-3), 166-175.
- PARIDA M. M., SANTHOSH S. R., DASH P. K., TRIPATHI N. K., SAXENA P., AMBUJ K. SAHNI A. K., LAKSHMANA RAO P. V. & MORITA K. (2006). Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4172–4178.
- SOLOMON T., NI H., BEASLEY D.W.C., EKKELENKAMP M., CARDOSA M.J. & Barrett A.D.T. (2003). Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in Southeast Asia. *J. Virol.*, **77**, 3091–3098.
- TANAKA M. (1993). Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **41**, 311–322.
- UCHIL P.D. & SATCHIDANANDAM V. (2001). Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 242–251.
- WILLIAMS D.T., WANG L.F. DANIELS P.D. & MACKENZIE J.S. (2000). Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J. Gen. Virol.*, **65**, 2471–2480.
- WILLIAMS D.T., DANIELS P.D., LUNT R.A., WANG L.F. NEWBERRY K.M. & MACKENZIE J.S. (2001). Experimental infections of pigs with Japanese encephalitis virus and closely related Australian flaviviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65** (4), 379–387.
- WILLIAMS D.T., MACKENZIE J.S & DANIELS P.D. (2012). Flaviviruses. *In: Diseases of swine*, 10th Edition, Zimmerman J.J., Karriker L., Ramirez A., Schwartz K & Stevenson G., eds. Wiley-Blackwell, Ames Iowa, USA pp 528-537
- XINGLIN J., HUANCHUN C., QIGAI H., XIANG W., BIN W., DEXIN Q. & LIURONG F. (2002) The development and application of the latex agglutination test to detect serum antibodies against Japanese encephalitis virus. *Vet. Res. Commun.*, **26**, 495–503.

YANG D.K., KIM B.H., LIM S.I., KWON J.H., LEE K.W., CHOI C.U. & KWEON C. (2006). Development and evaluation of indirect ELISA for the detection of antibodies against Japanese encephalitis in swine. *J. Vet. Sci.*, 7, 271-275.

\*

\* \*

**NB:** Имеется Референтная лаборатория МЭБ по японскому энцефалиту (см. таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или самый обновленный список, помещенный на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Дополнительную информацию по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам для японского энцефалита можно получить в данной Референтной лаборатории МЭБ.