

## БОЛЕЗНЬ МАРЕКА

---

### РЕЗЮМЕ

*Болезнь Марека (БМ) - это лимфоматозная и невропатическая болезнь домашней птицы, вызываемая альфагерпесвирусом, обозначаемым вирусом болезни Марека, принадлежащим к роду Mardivirus.*

*Диагностика осуществляется по клиническим признакам и макроскопическим или микроскопическим поражениям. Окончательный диагноз должен быть поставлен на основе диагностирования болезни (опухоли), а не инфекции. Куры могут становиться персистентно инфицированы вирусом болезни Марека без развития клинической формы болезни. Инфицирование вирусом болезни Марека определяется посредством выделения вируса и демонстрации вирусного антигена или антител.*

*Профилактика болезни Марека осуществляется вакцинацией моновалентными или поливалентными живыми вирусными вакцинами различных типов. Вакцина вводится либо при выведении либо, все чаще in ovo на 17 – 19 день инкубации.*

*У кур болезнь Марека возникает в возрасте 3-4 недель или старше, иногда даже гораздо позднее начала периода яйцекладки. Наблюдаемые клинические признаки охватывают: паралич ног и крыльев, увеличение периферических нервов, хотя поражение нервов иногда не наблюдается, особенно у взрослых птиц. Штаммы вируса болезни Марека с более высокой вирулентностью могут также стать причиной повышенного уровня смертности у молодых птиц в возрасте 1 – 2 недель, особенно если у них недостаточно материнских антител. В зависимости от штамма вируса болезни Марека могут возникнуть лимфоматозные поражения, особенно в яичнике, печени, селезенке, почках, легких, сердце, преджелудке и на коже. Опухоли, вызываемые вирусом болезни Марека, могут быть схожи с опухолями, продуцируемыми ретровирусными патогенами, такими как ретровирус птиц и ретикулоэндотелиальный вирус, их дифференциация очень важна. По сравнению с однородными клеточными популяциями, наблюдаемыми при лимфоидном лейкозе, лимфомы болезни Марека состоят из плеоморфических лимфоидных клеток различных типов.*

**Идентификация возбудителя:** *В полевых условиях большинство кур инфицируются вирусом болезни Марека в течение первых нескольких недель жизни, и являются носителями инфекции всю свою жизнь, часто даже без развития явной болезни. Инфекция часто выявляется посредством инокуляции живых лейкоцитарных клеток на монослойные культуры клеток почек кур или фибробласты эмбрионов уток, в которых развиваются характерные вирусные бляшки в течение нескольких дней. Вирус болезни Марека принадлежит роду Mardivirus, который включает в себя три вида (серотипа), обозначаемые как Gallid herpesvirus 2 (серотип 1), Gallid herpesvirus 3 (серотип 2) и Meleagrid herpesvirus 1 или герпесвирус индеек (ГВИ) (серотип 3). Серотип 1 включает все вирулентные штаммы и некоторые аттенуированные вакцинные штаммы. Серотип 2 включает естественно авирулентные штаммы, некоторые из которых используются в качестве вакцинных. Антигенно родственный ГВИ также используется в вакцине против болезни Марека, и с недавних пор, в качестве рекомбинантного вирусного вакцинного вектора. ДНК генома вируса болезни Марека и вирусные антигены можно*

обнаружить в кончиках перьев инфицированных птиц с помощью реакции полимеразной цепной реакции (ПЦР) и радиальной преципитации, соответственно. Эти молекулярные диагностические тесты можно применять для дифференциации патогенных и вакцинных штаммов.

**Серологические тесты:** Антитела к вирусу болезни Марека развиваются в течение 1-2 недель после заражения и обычно распознаются в реакции иммунодиффузии в агаровом геле или реакции непрямой иммуофлюоресценции.

**Требования к вакцинам:** Профилактика болезни Марека осуществляется посредством вакцинации кур *in ovo* на 17 – 19 день инкубации или в день выведения. Наиболее эффективными вакцинами являются аттенуированные варианты штаммов вируса болезни Марека серотипа 1. Штаммы серотипа 2 также могут применяться, особенно в бивалентных вакцинах наряду с герпесвирусом индеек. Вакцины на основе серотипа 1 и 2 пригодны только в клеточно-ассоциированной форме. Живые вакцины против герпесвируса индеек широко применяются и доступны как бесклеточной (лиофилизированной), так и клеточно-ассоциированной («влажной») форме. Бивалентные вакцины, состоящие из серотипов 1 и 3, или трехвалентные вакцины, состоящие из серотипов 1, 2 и 3, также используются. Бивалентные и трехвалентные вакцины были разработаны для борьбы с особо вирулентными штаммами вируса болезни Марека, которые плохо контролируются обычными моновалентными вакцинами.

Вакцинация значительно снижает уровень клинических проявлений болезни, но не снижает уровень персистентной инфекции и выделение вируса болезни Марека в окружающую среду. Домашняя птица также является носителем вирусов вакцины всю свою жизнь, хотя их выделение в окружающую среду не является повсеместным фактом.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Марека (Davison & Nair, 2004; Schat & Nair, 2013; Sharma, 1998) - это заболевание домашней птицы (кур), вызываемое герпесвирусом рода *Mardivirus*. Род включает в себя три вида (серотипа), обозначаемые как *Gallid herpesvirus 2* (серотип 1), *Gallid herpesvirus 3* (серотип 2) и *Meleagrid herpesvirus 1* или герпесвирус индеек (ГВИ) (серотип 3). Серотип 1 включает все вирулентные штаммы и некоторые аттенуированные вакцинные штаммы. Серотип 2 включает естественно авирулентные штаммы, некоторые из которых используются в качестве вакцинных. Антигенно родственный ГВИ также используется в вакцине против болезни Марека, и с недавних пор, в качестве рекомбинантного вирусного вакцинного вектора.

Птицы заражаются посредством вдыхания инфицированной пыли в птичниках, и в течение жизненного цикла вирус выделяется в среду из перьевого фолликула инфицированных птиц (Baigent & Davison, 2004). Болезнь Марека может возникнуть в любом возрасте, начиная с 3 - 4 недель или старше, иногда даже гораздо позднее начала периода яйцекладки. Болезнь Марека ассоциирована с несколькими явными патологическими синдромами, из которых наиболее частыми и имеющими наиболее практическое значение являются лимфопролиферативные синдромы. В классической форме болезни, характеризующейся в основном вовлечением нервов, смертность редко превышает 10-15%, и может произойти через несколько недель или даже несколько месяцев. В острой форме, при которой обычно происходит образование висцеральных лимфом во множестве внутренних органов, инцидентность болезни 10-30 % в стаде не является обычной, и могут возникать вспышки, охватывающие до 70 %. Уровень

смертности может быстро возрасти в течение нескольких недель и затем прекратиться, или продолжаться при устойчивом или медленном показателе снижения в течение нескольких месяцев. При острой форме болезни птицы часто находятся в угнетенном состоянии, и некоторые могут погибать без проявления клинических признаков болезни. Признанным фактом является то, что болезнь, не являющаяся неопластической, включая патологию мозга с вазогенным отеком, приводящим к временному параличу, все чаще признается болезнью Марека, индуцированной более вирулентными штаммами вируса.

В классической форме характерный показатель болезни Марека это частичный или полный паралич крыльев и ног. Характерным признаком является увеличение одного или более периферических нервов. Из них, наиболее часто поражаемые и легко обнаруживаемые при послеубойном обследовании это блуждающий нерв, брахиальные и седалищные нервные сплетения. Пораженные нервы часто в два или три раза больше своей нормальной толщины, отсутствуют обычные перекрестные бороздки и блестящий вид, а нерв может быть сероватым или желтоватым и иногда отечным. Лимфомы иногда проявляются при классической форме болезни Марека и чаще всего представляют собой небольшие, мягкие, серые опухоли в яичнике, и также иногда в легких, почках, сердце, печени и других тканях. «Серый глаз», вызываемый иридоциклитом, который приводит к тому, что птица неспособна осуществлять аккомодацию радужки глаза при реакции на свет и вызывает искажение зрачка, обычно проявляется у более взрослых птиц (16-18 недель) и может быть единственным признаком.

В острой форме типичным показателем является обширное диффузное лимфоматозное поражение печени, гонад, селезенки, почек, легких, преджелудка и сердца. Иногда лимфомы также возникают на коже вокруг перьевых фолликулов и в скелетных мышцах. Больные птицы обычно имеют увеличенные периферические нервы, как и при классической форме. У молодых птиц увеличение печени обычно умеренное, у взрослых птиц печень может быть сильно увеличена, а макроскопическая картина, идентична той, которая проявляется при лимфоидном лейкозе, от которого необходимо эту болезнь дифференцировать. У взрослых птиц с болезнью Марека поражения нервов часто не наблюдаются.

Гетерогенная популяция лимфоидных клеток в лимфомах, вызываемых болезнью Марека, наблюдаемая на окрашенных гематоксилином и эозином срезах или в мазках-отпечатках лимфом, окрашенных красителем Май-Грюнвальд-Гимза, является важной характеристикой для дифференциации болезни от лимфоидного лейкоза, при котором лимфоматозные инфильтрации состоят из однородных лимфобластов. Другая важная разница заключается в том, что при лимфоидном лейкозе макроскопические лимфомы возникают в фабрициевой сумке, а опухоль имеет интрафолликулярное происхождение и характер пролиферации. При болезни Марека, несмотря на то, что иногда в лимфопролиферацию вовлекается бурса, опухоль является менее явной, диффузной и интерфолликулярной по расположению. Поражения периферических нервов не являются характерной чертой лимфоидного лейкоза как при болезни Марека. Труднее всего различать лимфоидный лейкоз и формы болезни Марека, наблюдаемые у взрослых птиц, когда опухоль является лимфобластной со значительным увеличением печени и отсутствием нервных поражений. Если послеубойное обследование проводится на нескольких пораженных птицах, диагноз может быть обычно поставлен, основываясь на макроскопических поражениях и гистопатологии. Однако существуют другие специфические методы. Экспрессия биохимического маркера Meq используется для дифференциации между опухолями, вызываемыми болезнью Марека, латентными инфекциями вирусом болезни Марека и опухолями, индуцированными ретровирусом (Schat & Nair, 2013). Эта процедура может потребовать специальных реагентов и

оборудования, и вероятно невозможно провести эти исследования в лабораториях, не оснащенных данными техническими средствами. Разработка ряда диагностических исследований, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволила осуществлять экспресс диагностику патогенных штаммов вируса болезни Марека (Schat & Nair, 2013). Другие методы, такие как обнаружение с использованием метода иммунофлуоресценции активированных Т-клеточных антигенов, присутствующих на поверхности опухолевых клеток при болезни Марека (ассоциированный с опухолью, вызванной болезнью Марека, поверхностный антиген или MATSA), или В-клеточных антигенов, или IgM на опухолевых клетках лимфоидного лейкоза могут помочь при постановке предположительного диагноза, но они не специфичны для опухолевых клеток, индуцируемых болезнью Марека.

Нервные поражения и лимфоматозные пролиферации, индуцируемые определёнными штаммами вируса ретикулоэндотелиоза, схожи, как макроскопически, так и микроскопически с поражениями, имеющими место при болезни Марека. Хотя вирус ретикулоэндотелиоза нечасто встречается в куриных стадах, следует расценивать его как возможную причину лимфоидных опухолей; его распознавание зависит от вирусологических и серологических тестов, проводимых на птицах стада. Вирус ретикулоэндотелиоза может также вызывать неопластическую болезнь у индеек, уток, куропаток и других видов. Другой ретровирус, обозначаемый как вирус лимфопролиферативной болезни, также вызывает лимфопролиферативную болезнь у индеек. Несмотря на то, что куриные стада могут быть серопозитивными по вирусу ретикулоэндотелиоза, неопластическая болезнь является редким случаем. Основные характеристики, рассматриваемые при дифференциальной диагностике болезни Марека, лимфоидного лейкоза и ретикулоэндотелиоза, приведены в таблице 1. Периферическая невропатия является синдромом, который легко спутать с неврологическими поражениями, вызываемыми вирусом болезни Марека. Это не совсем распространено, но инцидентность может повышаться в некоторых европейских стадах (Vason *et al.*, 2001). Опасность для здоровья людей, работающих с вирусом болезни Марека или родственным герпесвирусом индеек, не доказана (Schat & Erb, 2014).

**Таблица 1.** Характеристики, используемые для дифференциации болезни Марека, лимфоидного лейкоза и ретикулоэндотелиоза

Признак	Болезнь Марека	Лимфоидный лейкоз	Ретикулоэндотелиоз*
Возраст	Любой возраст. Обычно 6 недель или старше	Не моложе 16 недель	Не моложе 16 недель
Признаки	Часто паралич	Неспецифические	Неспецифические
Инцидентность	Часто выше 5% в невакцинированных стадах. Редко в вакцинированных стадах	Редко выше 5%	Редко
<i>Макроскопические поражения</i>			
Нервное поражение	Часто	Отсутствует	Нечасто
Фабрициева сумка	Диффузная гипертрофия или атрофия	Узелковые опухоли	Узелковые опухоли
Опухоли в коже, мышцах и железистом	Могут присутствовать	Обычно отсутствуют	Отсутствуют

желудке, «серый глаз»

<i>Микроскопические поражения</i>			
Нервное поражение	Да	Нет	Нечасто
Печёночные опухоли	Часто периваскулярные	Очаговые или диффузные	Очаговые
Селезёнка	Диффузные	Часто очаговые	Очаговые или диффузные
Фабрициева сумка	Интерфолликулярная опухоль и/или атрофия фолликул	Интрафолликулярная опухоль	Интрафолликулярная опухоль
Центральная нервная система	Да	Нет	Нет
Лимфоидная пролиферация в коже и перьевых фолликулах	Да	Нет	Нет
Цитология опухолей	Плеоморфные лимфоидные клетки, включая лимфобласты, мелкие, средние и крупные лимфоциты и клетки ретикулула. Редко могут быть только лимфобласты	Лимфобласты	Лимфобласты
Категория неопластических лимфоидных клеток	Т-клетка	В-клетка	В-клетка

\* Вирус ретикулоэндотелиоза может вызывать несколько различных синдромов. Синдром бурсальной лимфомы вероятнее всего встречается в полевых условиях и описан здесь.

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

*Таблица 1. Методы исследования, доступные для диагностики болезни Марека и их назначение*

Метод	Назначение					
	Благополучие популяции по инфекции	Индивидуальное благополучие животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегию искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>						
<b>Гистопатология</b>	н/д	н/д	н/д	+++	+	-
<b>Выделение вируса</b>	н/д	н/д	н/д	+	-	-

<sup>1</sup> Рекомендуется комбинация методов идентификации возбудителя, применяемых на одном и том же клиническом образце.

<b>Выявление антигена</b>	н/д	н/д	н/д	+	-	-
<b>кПЦР в реальном времени</b>	н/д	н/д	н/д	++	+	-
<b>Выявление иммунного ответа</b>						
<b>AGID</b>	н/д	н/д	н/д	-	+	+
<b>РИФ</b>	н/д	н/д	н/д	-	+	+

Объяснение: +++ = рекомендуемый метод, валидированный для этой цели; ++ = подходящий метод, но может потребоваться дополнительная валидация; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но затраты, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для этих целей; н/д - назначение не применимо; кПЦР = количественная полимеразная цепная реакция; AGID = реакция иммунодиффузии в агаровом геле; РИФ – реакция непрямой иммунофлюоресценции.

## 1. Идентификация возбудителя

### 1.1. Выделение вируса

Заражение вирусом болезни Марека в стаде можно обнаружить путём выделения вируса из тканей инфицированных кур. Однако, необходимо учитывать повсеместный характер вируса болезни Марека, а диагностика болезни Марека должна быть основана на комбинации выделения или выявления генома вируса посредством ПЦР и проявления клинической картины болезни. К обычно используемым источникам относятся клетки лейкоцитарной плёнки из гепарированных образцов крови или суспензии клеток лимфом или селезёнки. Если эти образцы отбирают в полевых условиях, настоятельно рекомендуется транспортировать их в лабораторию охлажденными, но не замороженными. Так как вирус болезни Марека является высокоассоциированным с клетками, важно чтобы эти клеточные суспензии содержали жизнеспособные клетки. Клеточные суспензии высевают в монослойные культуры клеток куриной почки или фибробластов утиных эмбрионов (фибробласты куриных эмбрионов менее чувствительны для первичного выделения вируса). Вирусы серотипа 2 и 3 (см. Раздел С.2.1. Характеристики посевного материала) легче выделять в фибробластах куриных эмбрионов по сравнению с клетками куриной почки. Обычно 0,2 мл суспензии, содержащей от  $10^6$  до  $10^7$  живых клеток, высевают в дубликатные монослои, выращенные в пластиковых чашках для клеточных культур (диаметром 60 мм). Привитые и непривитые контрольные культуры инкубируют при 37°C во влажном инкубаторе, содержащем 5% CO<sub>2</sub>. Альтернативным образом могут использоваться закрытые культуральные сосуды. Культуральную среду меняют с интервалом в 2 дня. Области цитопатогенного действия, называемые бляшками, появляются в течение 3-5 дней и могут подсчитываться на 7-10 день.

Другим менее часто используемым источником вируса болезни Марека для диагностических целей являются кончики перьев, из которых можно экстрагировать бесклеточный вирус болезни Марека. Кончики длиной около 5 мм или измельчённые птерилии кожи, содержащие перьевые кончики, суспендируют в SPGA/EDTA (сахароза, фосфат, глутамин и альбумин/этилен диамин тетрауксусная кислота) буфере для экстрагирования и титрования бесклеточного вируса болезни Марека (Calnek *et al.*, 1970). Буфер готовят следующим образом: 0,2180 М сахарозы (7,462 г); 0,0038 М монокалия фосфата (0,052 г); 0,0072 М дикалия фосфата (0,125 г); 0,0049 М L – мононатрия глутамата (0,083 г); 1,0% порошок бычьего альбумина (1,000 г); 0,2% УВЕФ (0,200 г); и дистиллированная вода (100 мл). Буфер стерилизуют фильтрацией и он должен иметь приблизительное значение pH равное 6,5.

Эту суспензию обрабатывают ультразвуком, а затем фильтруют через 0,45 мкм мембранный фильтр для последующего высева на дренированные в течение 24 часов клеточные монослои куриной почки. После абсорбции в течение 40 минут добавляют среду и культуры инкубируют вышеуказанным способом в течение 7-10 дней.

С помощью этих методов можно выделять вирус болезни Марека серотипов 1 и 2 вместе с герпесвирусом индеек (серотип 3), если он присутствует в результате вакцинации. При наличии опыта, бляшки, вызываемые различными серотипами вируса, могут довольно точно дифференцироваться на основе времени появления, скорости образования и морфологии. Бляшки герпесвируса индеек появляются раньше и они крупнее, чем бляшки вируса серотипа 1, тогда как бляшки серотипа 2 появляются позже и по размеру меньше бляшек вируса серотипа 1.

Бляшки вируса болезни Марека и герпесвируса индеек могут быть идентифицированы с использованием специфических флуоресцирующих антител, полученных на цыплятах. Моноклональные антитела могут использоваться для дифференциации серотипов (Lee *et al.*, 1983).

## **1.2. Выявление антигена**

Вариант реакции иммунодиффузии в агаровом геле, используемой для проведения серологии (см. ниже), может применяться для выявления антигена вируса болезни Марека в кончиках перьев, как признака инфекции вирусом болезни Марека. Предметные стекла подготавливают путём покрытия их 0,7% агарозой (напр. А37) в 8% хлориде натрия с содержанием антисыворотки. Кончики небольших перьев отбирают от птиц на исследование и вставляют вертикально в агар, а стекла оставляют в положении, описанном ниже. Формирование радиальных зон преципитации вокруг кончиков перьев означает присутствие в перье антигена вируса болезни Марека, а значит инфекцию у птицы.

## **1.3. Полимеразная цепная реакция**

Были полностью секвенированы геномы всех трёх серотипов (Afonso *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000). Тесты с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) были разработаны для диагностики болезни Марека. Была описана количественная ОТ-ПЦР в реальном времени для квантификации копий генома вируса болезни Марека (Abdul-Careem *et al.*, 2006; Baigent *et al.*, 2005; Islam *et al.*, 2004). К тому же были описаны ПЦР исследования, позволяющие дифференцировать онкогенные и неонкогенные штаммы вируса болезни Марека серотипа 1 и вакцинные штаммы вируса болезни Марека серотипов 2 и 3 (Becker *et al.*, 1992; Bumstead *et al.*, 1997; Handberg *et al.*, 2001; Silva, 1992; Zhu *et al.*, 1992). Также были описаны две методологии по дифференциации онкогенных и неонкогенных штаммов серотипа 1 вируса болезни Марека с помощью количественной ПЦР (Baigent *et al.*, 2016; Gimeno *et al.*, 2014). ПЦР может также использоваться для количественного определения вирусной нагрузки в тканях (Baigent *et al.*, 2005; Bumstead *et al.*, 1997; Burgess & Davison, 1999; Reddy *et al.*, 2000) или дифференциального обнаружения вируса болезни Марека и герпесвируса индеек в крови или кончиках перьев (Baigent *et al.*, 2005; Davidson & Borenshtain, 2002). Модификация ПЦР исследования, обозначаемая как LAMP (изотермическая амплификация с формированием петель) также используется для выявления и дифференциации серотипов вируса болезни Марека (Wozniakowski *et al.*, 2013).

**Таблица 3. Примеры наборов ПЦР праймеров, применяемые для идентификации вируса болезни Марека**

Специфичность ВБМ	Набор праймеров	Размер продукта	Справочная литература
pp38	Прямой: : 5'-GTG-ATG-GGA-AGG-CGA-TAG-AA-3' Обратный: 5'-TCC-GCA-TAT-GTT-CCT-CCT-TC-3'	225 п.о.	Сао <i>et al.</i> , 2013
gB	Прямой: 5'-CGG-TGG-CTT-TTC-TAG-GTT-CG-3' Обратный: 5'-CCA-GTG-GGT-TCA-ACC-GTG-A-3'	66 п.о.	Gimeno <i>et al.</i> , 2005
Meq	Прямой: 5'-GAG-CCA-ACA-AAT-CCC-CTG-AC-3' Обратный: 5'-CTT-TCG-GGT-CTG-TGG-GTG-T-3'	1,41 кп	Dunn <i>et al.</i> , 2010

## 2. Серологические тесты

Присутствие антител к вирусу болезни Марека у невакцинированных цыплят в возрасте около 4 недель указывает на инфекцию. До этого возраста такие антитела могут свидетельствовать о материнской передаче антител через желток, а не о наличии активной инфекции.

Вирусы, антигены и антисыворотки обычно можно получить в справочных лабораториях МЭБ по болезни Марека (см. таблицу в Части 4 этого *Руководства по наземным животным*), но международные стандартные реагенты получены пока не были.

### 2.1. Иммунодиффузия в агаровом геле

Для сертификации отдельных животных до перемещения не существует подходящего теста, но для обнаружения антител чаще всего используется иммунодиффузия в агаровом геле. Тест проводится с использованием стеклянных предметных стёкол, покрытых 1% агаром в забуференном фосфатом физиологическом растворе, содержащем 8% хлорид натрия. Смежные лунки заполняют антигеном или сывороткой и инкубируют во влажной атмосфере при 37°C в течение 24 часов в целях диффузии; положительные сыворотки демонстрируют реакции идентичности с известной положительной сывороткой и антигеном. Антиген, используемый в данном тесте, представляет или разрушенные клетки инфицированной вирусом болезни Марека культуры ткани, или экстракт перьевых кончиков, или кожу, содержащую птерилии, полученные от инфицированных вирусом болезни Марека кур. Антиген клеточной культуры готовят путём размножения вируса болезни Марека в клетках куриной почки или клетках фибробластов куриных эмбрионов. Когда цитопатогенное действие становится конфлюэнтным, клетки отделяют от культурального сосуда и суспендируют в культуральной среде или забуференном фосфатом физиологическом растворе без триптоза-фосфатного бульона (присутствие триптоза-фосфатного бульона может продуцировать неспецифические преципитиновые линии) в концентрации около  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Эту суспензию затем трижды подвергают замораживанию и оттаиванию и используют в качестве антигена.

#### 2.1.1. Процедура проведения теста

- i) Приготовить 1% раствор агара в 8% хлориде натрия, дав смеси постоять на кипящей водяной бане.



- ii) Можно использовать либо предметное стекло, либо чашку Петри, на которое нанести агар слоем толщиной 2-3 мм.
- iii) Сделать отверстия в агаре с помощью матрицы с центральной лункой и 6 лунками, расположенными на равных интервалах вокруг центральной лунки. Диаметр лунок должен составлять 5,3 мм, и лунки должны находиться на расстоянии приблизительно 2,4 мм друг от друга. Матрица с пробойниками имеется в продаже.
- iv) Антиген поместить в центральную лунку, а стандартную антисыворотку во внешние противоположные лунки. Образцы сыворотки, подлежащие исследованию, поместить в оставшиеся три лунки таким образом, чтобы формировалась непрерывная линия идентичности между неизвестным образцом, который является положительным и известно положительной контрольной сывороткой.
- v) Инкубировать предметное стекло в течение 24 часов при 37°C во влажном контейнере и считывать показания над лампой в затемнённой комнате.

## **2.2. Реакция непрямой иммунофлюоресценции**

Реакция непрямой иммунофлюоресценции демонстрирует способность опытной сыворотки окрашивать бляшки вируса болезни Марека в культуре клеток (Silva *et al.*, 1997; Spencer & Calnek, 1970). Эти тесты являются группоспецифичными и более чувствительными чем иммунодиффузия в агаровом геле.

### **2.2.1. Процедура проведения теста**

- i) Приготовить антиген вируса болезни Марека на культуральных планшетах или 96-луночных планшетах.
- ii) Зафиксировать клетки смесью ацетона и спирта на 10 минут, затем высушить на воздухе. Планшеты можно поместить в холодильник до тех пор, пока они не будут готовы к окрашиванию или замораживанию на более длительный период времени.
- iii) Увлажнить поверхность планшета ЗФР, удалить ЗФР, затем добавить сыворотку во множестве разведений (1:5, 1:10, 1:20, 1:40). Инкубировать на водяной бане или в инкубаторе при 37 °С в течение 30 – 60 минут.
- iv) Удалить сыворотку, промыть планшеты три раза дистиллированной водой, затем трижды промыть с ЗФР, промокнуть.
- v) Добавить очищенное, маркированное флуоресцеином антитело к куриному IgG. Инкубировать на водяной бане или в инкубаторе при 37 °С в течение 30 – 60 минут.
- vi) Повторить этап промывки, затем считать планшеты сразу же с помощью иммунофлюоресцентного микроскопа.

## **2.3. Другие тесты**

Можно использовать также реакцию вируснейтрализации для определения способности сыворотки нейтрализовать бляшкообразующие свойства бесклеточного вируса болезни Марека. Однако этот тест больше подходит для исследовательских целей, нежели для рутинного диагностического применения. Существует твёрдофазный иммуноферментный анализ (ИФА) для обнаружения антител к вирусу болезни Марека (Cheng *et al.*, 1984; Sharma, 1998; Zelnik *et al.*, 2004).

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ**

### **1. Историческая справка**

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

Контроль болезни Марека главным образом осуществляется благодаря широкому применению живых аттенуированных вакцин (Nair, 2004, Schat & Nair, 2013). Коммерческие биологические препараты, используемые для борьбы с болезнью Марека, это клеточно-ассоциированные живые вирусные вакцины. Лиофилизированные бесклеточные вакцины используются редко. Вакцины против болезни Марека вводят подкожно суточным цыплятам после выведения или *in ovo* на 17 – 19 день развития эмбриона (Sharma, 1999).

#### **2. Описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам**

Требования к производству вакцин указаны ниже и в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*, но за получением дополнительной информации о процедурах можно обратиться к другим источникам (Кодекс федеральных правил Титул 9 [9CFR], 2016; Европейская Фармакопея 1997a и 1997b; Merieux *et al.*, 1974; Министерство сельского хозяйства, рыболовства и продовольствия, Соединенное Королевство, 1990; Thornton, 1985). Протоколы приведены в Монографии Британской Фармакопеи 589 и 9CFR, Часть 113 (CFR, 2016). Руководящие принципы данного *Руководства по наземным животным* являются общими по своему характеру и могут дополняться национальными и региональными требованиями.

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

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

Вирусы группы вируса болезни Марека классифицируются на три серотипа – 1, 2 и 3, в зависимости от их антигенного родства.

##### **i) Серотип 1**

Он включает все патогенные штаммы вируса, начиная от штаммов, которые являются сверхвирулентными (например, 648A), очень вирулентными (например, Md/5, Md/11, Ala-8, RB-1B), вирулентными (например, HPRS-16, JM GA), умеренно вирулентными (например, HPRS-B14, Conn A) и заканчивая слабовирулентными (например, CU-2, CVI-988). Эти штаммы могут аттенуироваться пассажем в культуре ткани с утерей патогенных свойств, но с сохранением иммуногенности в целях получения штаммов, используемых в качестве вакцин. Те, что были использованы коммерческим

образом, включают аттенуированные штаммы HPRS-16 и CVI-988 (Rispens). Аттенуированные варианты очень вирулентных штаммов были использованы в экспериментальных вакцинах для защиты от вариантной формы острой болезни Марека, вызываемой очень вирулентными штаммами. Md11/75C/R2/23 – один из таких штаммов (Witter, 2001), лицензированных для использования в Соединённых Штатах Америки. Вакцины серотипа 1 готовят в клеточно-ассоциированной форме («влажной») и они должны храниться в жидком азоте.

ii) Серотип 2

Он включает естественно авирулентные штаммы вируса болезни Марека (например, SB-1, HPRS-24, 301B/1, HN-1), а некоторые из них обеспечивают защиту против вирулентных штаммов. Штаммы SB-1 и 301B/1 были получены коммерческим образом и использованы, в частности, с герпесвирусом индеек в бивалентных вакцинах для защиты против очень вирулентных штаммов. Вакцины серотипа 2 существуют только в клеточно-ассоциированной форме.

iii) Серотип 3

Он включает штаммы естественно авирулентного герпесвируса индеек (например, FC126, PB1), которые широко используются в качестве моновалентной вакцины, а также в комбинации со штаммами серотипов 1 и 2 в бивалентных или трёхвалентных вакцинах против очень вирулентных штаммов вируса болезни Марека. Герпесвирус индеек может также готовиться в бесклеточной форме в виде высушенной замораживанием (лиофилизированной) вакцины или в клеточно-ассоциированной («влажной») форме.

### **3. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних агентов)**

Субстратами, используемыми в производстве коммерческих вакцин, являются первичные фибробласты куриных эмбрионов, полученные из свободных от специфических патогенных факторов (СПФ) стад, или фибробласты утиных эмбрионов. Фибробласты куриных эмбрионов из СПФ стад предпочтительнее утиных клеток, так как имеется больше информации о передаваемых через куриные эмбрионы патогенах и методах их обнаружения.

Существуют методы исследований СПФ стад на свободу от инфекции (Министерство сельского хозяйства, рыболовства и продовольствия, Соединенное Королевство, 1990; Thornton, 1985). Куриные СПФ стада должны быть свободны от птичьих аденовирусов, включая вирус синдрома снижения яйценоскости-76, вируса энцефаломиелита птиц, вируса птичьего лейкоза (подгрупп А, В и J), вируса нефрита птиц, реовирусов птиц, ротавирусов птиц, вируса анемии кур, вируса оспы птиц, вируса инфекционного бронхита, вируса инфекционной бурсальной болезни, вируса ларинготрахеита, вируса гриппа типа А, вируса болезни Марека, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, вируса болезни Ньюкасла, вируса ретикулоэндотелиоза, *Salmonella* spp., и вируса ринотрахеита индеек. Благополучие по другим инфекциям также может потребоваться по мере их признания.

СПФ стада уток должны быть свободны от аденовирусов птиц, *Chlamydia*, вирусного энтерита уток, вирусного гепатита типов I и II уток, вируса гриппа типа А, вируса болезни Ньюкасла, *Pasteurella* (теперь *Riemerella*) *anatipestifer*, вируса ретикулоэндотелиоза и инфекций *Salmonella*. Свобода от других инфекций может также потребоваться в результате их признания.

Исходный посевной вирус должен быть свободен от агентов, перечисленных в отношении СПФ стад, и от других контаминантов, которые могут получены в лаборатории. Вакцинный штамм, полученный от индеек, должен также быть свободен от вируса лимфопролиферативной болезни и вируса геморрагического энтерита.

Необходимо определить способность исходного посевного вируса и производного вируса на пределе пассажного диапазона, используемого для производства вакцинного вируса (обычно не более пяти пассажей на культуре ткани), защищать от болезни Марека. Опубликованы стандартизированные тесты по установлению защиты. Они включают вакцинацию восприимчивых к болезни Марека СПФ цыплят в 1-дневном возрасте и контрольное заражение достаточной дозой вирулентного вируса болезни Марека через 5 – 8 дней с тем, чтобы вызвать, по меньшей мере, 70 – 80% инцидентность болезни Марека у невакцинированных цыплят. Используют два типа тестов. При проведении теста по определению индекса защиты вводят одну полевую дозу (1000 БОЕ) (бляшкообразующих единиц) вакцины и инцидентность заболевания болезни Марека среди вакцинированных птиц сравнивают с инцидентностью заболевания среди невакцинированных птиц. Защитные индексы должны быть выше 80, то есть вакцинированные птицы должны демонстрировать, по меньшей мере, 80% снижение в инцидентности макроскопических поражений по сравнению с невакцинированными контролями.

Используется также тест по определению PD<sub>50</sub> (50% защитная доза), который включает прививку четырёхкратными серийными разведениями вакцинного вируса для обеспечения защиты выше и ниже 50% уровня, за которой следует контрольное заражение 8 дней спустя с целью определения значения PD<sub>50</sub>. Анализы проводятся с использованием стандартной референтной вакцины для сравнения. Значение PD<sub>50</sub> может составлять 4 БОЕ, но могут быть получены более высокие показатели в зависимости от вакцинного штамма, то есть является ли он бесклеточным или ассоциирован с клетками, и присутствия или отсутствия материнских антител у экспериментальных цыплят. На основе теста по определению значения PD<sub>50</sub> было высказано предположение, что минимальная полевая доза вакцины не должна быть выше двух показателей: 10<sup>3</sup> БОЕ или 100 PD<sub>50</sub>.

Следует проводить расширенные полевые испытания нового вакцинного штамма с контрольным заражением в полевых условиях с использованием различных пород птиц с разным статусом в отношении материнских антител к вирусу болезни Марека для обеспечения эффективности и продолжительности иммунитета. Опыт показывает, что приобретённый вакцинный иммунитет сохраняется пожизненно.

## **2. Метод производства**

### **2.2.1. Процедура**

Вакцины против болезни Марека готовят из живых аттенуированных штаммов, принадлежащих 3 серотипам с использованием фибробластов куриных эмбрионов в качестве субстрата.

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

Субстратные клетки высевают в сосуды с плоским дном для стационарной инкубации или в цилиндрические сосуды для инкубации роллерного типа. Наиболее часто используют минимальную эссенциальную среду Игла или среду 199, забуференную бикарбонатом натрия и обогащённую 5% телячьей сывороткой. Инкубацию проводят при 37°C в течение 48 часов.

Для производства клеточно-ассоциированной вакцины культуры инфицируют производственным посевным герпесвирусом индеек или вирусом болезни Марека в клеточно-ассоциированной форме, которая на два пассажа превосходит расплодку. Культуры инкубируют в течение 48 часов (в зависимости от вакцинного штамма), затем инфицированные клетки собирают путём обработки отмытого пласта клеток раствором EDTA/трипсина с тем, чтобы клетки начали отделяться. Флаконы затем возвращают опять в инкубатор (37°C), чтобы добиться полного отделения. Клетки подвергают низкоскоростному центрифугированию, а затем ресуспендируют в жидкости для замораживания, состоящей из среды для выращивания клеток, которая содержит 7,5-15% диметилсульфоксида (ДМСО), и хранят при 4°C или сразу же распределяют по контейнерам для готовой вакцины, обычно в стеклянные ампулы, которые герметично закрывают с использованием стерилизации пламенем и замораживают в жидком азоте.

Бесклеточную лиофилизированную вакцину можно приготовить из герпесвируса индеек, но не из штаммов вируса болезни Марека. Для производства этой формы вакцины, инфицированные герпесвирусом индеек культуры инкубируют в течение 72 часов, инфицированные клетки отделяют от сосуда вышеописанным способом или соскребают со стенок. Клетки суспендируют в небольшом объёме ростовой среды, центрифугируют и ресуспендируют в забуференном стабилизирующем растворе, содержащем 8% сахарозу, но свободную от белка во избежание пенообразования. Клеточную суспензию подвергают воздействию ультразвука с целью высвобождения вируса, клеточный дебрис выводят, суспензию разводят полным стабилизатором, таким как SPGA, фасуют по конечным контейнерам и лиофилизируют.

Степень разбавления в отношении и клеточно-ассоциированных, и бесклеточных вакцин, базируется на предшествующем опыте, связанном с количеством доз, необходимым для каждого контейнера, так как содержание вируса в собранном материале нельзя проанализировать перед заполнением конечных контейнеров. Информацию о содержании вируса можно впоследствии внести в этикетку.

### **2.2.3. Производственный контроль**

В получении оптимальных результатов при производстве клеточно-ассоциированной вакцины важную роль играют низкая скорость замораживания (1-5°C в минуту) и быстрое оттаивание. Титр инфекционности инфицированных клеток и, следовательно, количество доз на ампулу определяют после заполнения ампул. Подобным образом в отношении бесклеточной вакцины содержание вируса в конечной суспензии и, следовательно, количество доз на контейнер определяют после заполнения.

## **4. Контроль партий готового продукта**

С помощью реакции иммунофлуоресценции (РИФ) с моноспецифичной сывороткой следует проводить проверки с целью демонстрации того, что продукт имеет ту же специфичность, что и посевной вирус. Это лучше всего делать с помощью моноклональных антител.

i) Стерильность/чистота

Необходимо экстенсивное исследование материалов, используемых для производства вакцин, и конечного продукта. Субстратные клетки должны происходить из СПФ стада, в частности, свободного от передаваемых вертикальным образом агентов. Вещества животного происхождения, используемые для приготовления вакцин, такие как сыворотка, трипсин и альбумин бычьей сыворотки, должны быть свободны от чужеродных агентов.

Партии произведённой конечной вакцины должны исследоваться на свободу от контаминирующих бактерий, грибов, микоплазм и вирусов, перечисленных в отношении СПФ стад; а также должны проводиться тесты на чистоту разбавителя. Подходящие тесты для обнаружения чужеродных агентов на всех этапах производства вакцины рекомендованы несколькими официальными органами (Министерство сельского хозяйства, рыболовства и продовольствия, Соединенное Королевство, 1990; 9CFR, 2016; Thornton, 1985) и в Главе 1.1.9. *Исследования на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов, предназначенных для ветеринарного применения.*

ii) Безопасность

Десять доз вакцины или количество разбавителя, эквивалентное двум дозам вакцины, следует вводить отдельным группам, состоящим из 10 – 25 суточных СПФ цыплят. В течение 21-дневного периода наблюдения не должно быть побочных реакций.

При использовании клеточно-ассоциированных вакцин необходимо принимать меры предосторожности во избежание травм от ампул, которые могут взрываться при выведении их из жидкого азота. Следует надевать защитные очки.

iii) Иммуногенность партии

Стандартная доза каждого типа вакцины составляет 1000 БОЕ на цыплёнка или яйцо, но может быть выше, в зависимости от титра, используемого в исследованиях эффективности. Анализы содержания вируса проводят на партиях вакцины в целях обеспечения верной дозы в расчёте на птицу.

## **2.3. Требования к выдаче разрешения**

### **2.3.1 Требования к безопасности**

i) Безопасность целевых животных

Необходимо продемонстрировать, что исходный посевной вирус является непатогенным для кур, посредством десятикратной инокуляции полевой дозы штамма суточным СПФ цыплятам, восприимчивым к болезни Марека, с целью обеспечения того, что он не вызывает макроскопических поражений или

значительных микроскопических поражений болезни Марека к возрасту 120 дней. Следует отметить, что некоторые вакцинные штаммы вируса болезни Марка и герпесвируса индеек могут продуцировать незначительные и проходящие микроскопические поражения нервов.

ii) Возврат к вирулентности атеннуированных живых вакцин

Повышение вирулентности не должно иметь места в течение шести серийных пассажей вакцинного штамма в суточных СПФ восприимчивых к болезни Марека цыплятах. Первоначально вводят десятикратную полевую дозу вакцины, а затем проводят пассаж путём введения гепарированной крови с 5-7-дневными интервалами и ставят тесты на вирулентность в целях проверки того, что вирус переносится при каждом пассаже. Птиц, получающих последний пассаж, содержат в течение 120 дней и они должны быть свободны от поражений, присущих болезни Марека. Тем не менее, некоторые штаммы, такие как Rispens, могут вызывать умеренные поражения болезни Марека. Важным наблюдением является то, что вирулентность не должна меняться. Это исследование сложное, так как генетическая резистентность цыплят коренным образом влияет на очевидную вирулентность вируса, как и данный тип прививочного материала. После успешного завершения лабораторных тестов на безопасность следует подтвердить безопасность штамма с помощью экстенсивных полевых испытаний.

### 2.3.2. Требования к эффективности

Тест по определению продолжительности иммунитета проводят только на посевном вирусе. Такой иммунитет является, очевидно, пожизненным. Консерванты не включены в вакцину или разбавитель. Во время использования восстановленная вакцина должна храниться в прохладном месте, а клеточно-ассоциированную вакцину следует встряхивать, чтобы клетки оставались в суспензии.

### 2.3.3. Стабильность

Тесты по определению стабильности проводят на шести репрезентативных партиях вакцины в целях демонстрации того, что титр поддерживается в течение установленного срока годности вакцины. Эти тесты должны проводиться в условиях хранения вакцины. Лиофилизированный продукт должен иметь срок годности 12 месяцев при хранении при 2-8°C. Изготовители могут увеличивать содержание вируса в вакцине в два раза с тем, чтобы компенсировать некоторую потерю титра во время хранения. С клеточно-ассоциированными и лиофилизированными вакцинами используются соответствующие разбавители. Следует проверять стабильность восстановленной вакцины в течение 2-часового периода.

## 3. Вакцины, основанные на биотехнологиях

### 3.1. Доступные вакцины и их преимущества

Генетически сконструированные рекомбинантные вакцины (Lee *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 1996), основанные на существующих живых вакцинах против болезни Марека, могут обеспечить одновременную защиту от других болезней птиц, в зависимости от защитных антигенов, встроенных в рекомбинантную вакцину. Ряд рекомбинантных

вакцин, основанных на векторах герпесвируса индеек, которые индуцируют защиту против таких болезней птиц, как грипп птиц, инфекционная бурсальная болезнь, болезнь Ньюкасла и инфекционный ларинготрахеит можно найти в продаже.

### **3.2. Особые требования к биотехнологическим вакцинам, при наличии**

Нет.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

ABDUL-CAREEM M.F., HUNTER B.D., NAGY E., READ L.R., SANEI B., SPENCER J.L. & SHARIF S. (2006). Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *J. Virol. Methods*, 133, 34–40.

AFONSO C.L., TUMLIN E.R., LU Z., ZSAK L., ROCK D.L. & KUTISH G.F. (2001). The genome of turkey herpesvirus. *J. Virol.*, 75, 971–978.

BACON L.D., WITTER R.L. & SILVA R.F. (2001). Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in white leghorn chickens. *Avian Pathol.*, 30, 487–499.

BAIGENT S.J. & DAVISON F. (2004). Marek's disease virus: biology and life cycle. In: *Marek's disease: An Evolving Problem*, Davison F. & Nair V., eds. Elsevier Academic Press, London, UK, 62–77.

BAIGENT S.J., NAIR V.K. & Le Galludec H. (2016). Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *J. Virol. Methods*, 233, 23–36.

BAIGENT S.J., PETHERBRIDGE L.J., HOWES K., SMITH L.P., CURRIE R.J.W. & NAIR V. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *J. Virol. Methods*, 123, 53–64.

BECKER Y., ASHER Y., TABOR E., DAVIDSON I., MALKINSON M. & WEISMAN Y. (1992). Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease virus (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3. *J. Virol. Methods*, 40, 307–322.

BUMSTEAD N., SILLIBOURNE J., RENNIE M., ROSS N. & DAVISON F. (1997). Quantification of Marek's disease virus in chicken lymphocytes using the polymerase chain reaction with fluorescence detection. *J. Virol. Methods*, 65, 75–81.

BURGESS S.C. & DAVISON T.F. (1999). A quantitative duplex PCR technique for measuring amounts of cell-associated Marek's disease virus: differences in two populations of lymphoma cells. *J. Virol. Methods*, 82, 27–37.

CALNEK B.W., HITCHNER S.B. & ADLDINGER H.K. (1970). Lyophilization of cell-free Marek's disease herpesvirus and a herpesvirus from turkeys. *Appl. Microbiol.*, 20, 723–726.

CAO W., MAYS J., DUNN J.R., FULTON R., SILVA R.F. & FADLY A.M. (2013). Use of polymerase chain reaction in detection of Marek's disease and reticuloendotheliosis viruses in formalin-fixed, paraffin-embedded tumorous tissues. *Avian Dis.*, 57, 785–789.



CHENG Y.-Q., LEE L.F., SMITH E.J. & WITTER R.L. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Marek's disease virus. *Avian Dis.*, 28, 900–911.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (CFR) (2016). Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.

DAVIDSON I. & BORENSHTAIN R. (2002). The feather tips of commercial chickens are a favourable source of DNA for the amplification of MDV and ALV-J. *Avian Pathol.*, 31, 237–240.

DAVISON F. & NAIR V. (EDS) (2004). *Marek's disease: An Evolving Problem*. Elsevier Press, Amsterdam, the Netherlands and Boston, USA.

DUNN J.R., SOUTHARD T., COOPER C., KIUPEL M. & WITTER R.L. (2010). Diagnosis of Marek's Disease from a Japanese Quail (*Coturnix Japonica*) Using Paraffin-embedded Liver [abstract]. In: American Association of Avian Pathologists Symposium and Scientific Program, 1–4 August, 2010, Atlanta, Georgia, USA, Paper No. 9389.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, THIRD EDITION (1997a). *Marek's Disease Vaccines (Live)*. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 1814–1818. ISBN 92-871-2990-8.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, THIRD EDITION (1997b). *Vaccines for Veterinary Use*. Chapter 5.2.2. Chicken flocks free from specified pathogens for the production and quality control of vaccines. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 301–304. ISBN 92-871-2990-8.

GIMENO I.M., DUNN J.R., CORTES A.L., EL-GOHARY AEL-G. & SILVA R.F. (2014). Detection and differentiation of CVI988 (Rispens Vaccine) from other serotype 1 Marek's disease viruses. *Avian Dis.*, 58, 232–243.

GIMENO I.M., WITTER R.L., FADLY, A.M. & SILVA R.F. (2005). Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. *Avian Pathol.*, 34, 332–340.

HANDBERG K.J., NIELSON O.L. & JORGENSEN P.H. (2001). Use of serotype 1 & serotype 3 specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.*, 30, 243–249.

ISLAM A., HARRISON B., CHEETHAM B.F., MAHONY T.J., YOUNG P.L. & WALKDEN-BROWN S.W. (2004). Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 119, 103–113.

LEE L.F., KREAGER K.S., ARANGO J., PARAGUASSU A., BECKMAN B., ZHANG H., FADLY A.M., LUPIANI B. & REDDY S.M. (2010). Comparative evaluation of vaccine efficacy of recombinant Marek's disease virus vaccine lacking Meq oncogene in commercial chickens. *Vaccine*, 28, 1294–1299.

LEE L.F., LIU X. & WITTER R.L. (1983). Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease virus in chickens. *J. Immunol.*, 130, 1003–1006.

LEE L.F., WU P., SUI D., REN D., KAMIL J., KUNG H.J. & WITTER R.L. (2000). The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97, 6091–6096.

MERIEUX C., HULSE E.C., GAUDRY D., ALLAN W.H., REGAMEY R.H., EDS (1974). *International Symposium on Requirements for Poultry Virus Vaccines. Proceedings of the 42nd Symposium, International Association of Biological Standardization, Lyon, France, August 1973. Dev. Biol. Stand.*, 25, 423.

MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1990). *Guidelines for the Production and Control of Avian Virus Vaccine. MAL 74. HMSO, London, UK.*

NAIR V. (2004). Successful control of Marek's disease by vaccination. In: *Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination*, Schudel A. & Lombard M., eds. *Dev. Biol. (Karger, Basel, Switzerland)*, 119, 147–154.

REDDY S.K., SHARMA J.M., AHMAD J., REDDY D.N., MCMILLEN J.K., COOK S.M., WILD M.A. & SCHWARTZ R.D. (1996). Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, 14, 469–477.

REDDY S.M., WITTER R.L. & GIMENO I.M. (2000). Development of a quantitative-competitive polymerase chain reaction assay for serotype 1 Marek's disease virus. *Avian Dis.*, 44, 770–775.

SCHAT K.A. & ERB H.N. (2014). Lack of evidence that avian oncogenic viruses are infectious for humans: a review. *Avian Dis.*, 58, 345–358.

SCHAT K.A. & NAIR V (2013). Marek's disease. In: *Diseases of Poultry, Thirteenth Edition*, Swayne D.E. et al., eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 515–552.

SHARMA J.M. (1998). Marek's disease. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4th Edition*. Swayne D.E. et al., eds. American Association of Avian Pathologists, 116–124.

SHARMA J.M. (1999). Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv. Vet. Med.*, 41, 481–494.

SILVA R.F. (1992). Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. *Avian Dis.*, 36, 521–528.

SILVA R.F., CALVERT J.G. & LEE L.F. (1997). A simple immunoperoxidase plaque assay to detect and quantitate Marek's disease virus plaques. *Avian Dis.*, 41, 528–534.

SPENCER J.L. & CALNEK B.W. (1970). Marek's disease: application of immunofluorescence for detection of antigen and antibody. *Am. J. Vet. Res.*, 31, 345–358.

THORNTON D.H. (1985). Quality control and standardisation of vaccines. In: *Marek's Disease*, Payne L.N. ed. Martinus Nijhoff, Boston, USA, 267–291.

WITTER R.L. (2001). Protective efficacy of Marek's disease vaccines. In: Marek's disease, Hirai K., ed. SpringerVerlag, Berlin, Germany, 58–90.

WOZNAKOWSKI G., SAMOREK-SALAMONOWICZ E. & KOZDRUN W. (2013). Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3. *Avian Dis.*, 57 (2 Suppl.), 539–543.

ZHU G.-S., OJIMA T., HIRONAKA T., IHARA T., MIZUKOSHI N., KATO A., UEDA S. & HIRAI K. (1992). Differentiation of oncogenic and non-oncogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. *Avian Dis.*, 36, 637–645.

ZELNIK V., HARLIN O., FEHLER F., KASPERS B., GOEBEL T. W., NAIR V. & OSTERRIEDER N. (2004). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of marek's disease virus-specific antibodies and its application in an experimental vaccine trial. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 51, 61–67.

\*

\*\*

NB: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по болезни Марека  
(См. Таблицу в Части 4 этого Наземного руководства или сайт МЭБ, чтобы получить  
самый последний список:

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Пожалуйста, свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения любой  
дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против  
болезни Марека

NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1990 Г. ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИНЯТЫ В 2017 Г.