

ГЛАВА 3.4.12

Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / Инфекционный пустулезный вульвовагинит

РЕЗЮМЕ

Описание заболевания: *Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / инфекционный пустулезный вульвовагинит (ИР КРС/ИПВ), вызванный бычьим герпесвирусом 1 (БГВ-1), является заболеванием домашнего и дикого крупного рогатого скота. Вирус распространен по всему миру, однако в ряде европейских стран он был искоренен, а в других действуют программы по борьбе с данным вирусом.*

Заболевание характеризуется проявлением клинических признаков в области верхних дыхательных путей, такими как слизисто-гнойные и гнойные назальные выделения, гиперемия морды («красный нос») и конъюнктивит. Признаками общего заболевания являются лихорадка, депрессия, отсутствие аппетита, абортирования и снижение удоев молока. Вирус может также инфицировать половые пути и вызывать пустулезный вульвовагинит и баланопостит. В ходе патологоанатомических обследований выявляют ринит, ларингит и трахеит. Уровень смертности низкий, большинство инфекций проходят бессимптомно. Вторичные бактериальные инфекции могут приводить к более тяжелым респираторным болезням, и БГВ-1 может способствовать развитию комплексных болезней, таких как «транспортная лихорадка».

Идентификация возбудителя: *Вирус выделяют из носовых или генитальных смывов животных, демонстрирующих респираторные признаки болезни, вульвовагинит или баланопостит, взятых во время острой фазы болезни, а в тяжелых случаях - из различных органов после вскрытия. После заражения БГВ-1 сохраняется в организме инфицированных животных в латентном состоянии в сенсорных нейронах, например в тригеминальных или крестцовых узлах. Вирус может регенерировать, что приводит к выделению вируса в среду (повторная экскреция) без клинических проявлений болезни. В силу такой латентности сероположительные животные классифицируют в качестве инфицированных БГВ-1 (с двумя исключениями: серологические реакции, вызванные вакцинацией инактивированной вакциной или колостральными антителами).*

Для выделения вируса используют различные клеточные культуры КРС, например, вторичные клетки ткани легких или почек или линию клеток Мадин-Дарби почек КРС. Вирус продуцирует цитопатическое действие через 2- 4 дня. Его идентифицируют методами нейтрализации или выявления антигена с использованием моноспецифических антисывороток или моноклональных антител. Изоляты БГВ-1 дополнительно субтипировать по подтипам 1.1 и 1.2 путем рестрикционного ДНК-анализа. Изоляты БГВ-1.2 могут быть дополнительно дифференцированы на 2a и 2b. Развитие ринотрахеита или вульвовагинита / баланопостита в большей степени зависит от способа заражения, нежели от подтипа вируса. Вирус, ранее называемый БГВ-1.3, нейрпатогенный агент, в настоящее время классифицируют как БГВ-5.

Для обнаружения вирусной ДНК в рутинной диагностике все чаще используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в частности, ПЦР в реальном времени.

Серологические тесты: *Для обнаружения антител наиболее широко используют реакции вируснейтрализации и различные иммуноферментные анализы (ИФА, непрямые или блокирующие). С помощью ИФА антитела обнаруживают в сыворотке или плазме и при более низкой чувствительности - в молоке или в объемных пробах молока. Использование системы ИФА для выявления антител к gE позволяет дифференцировать КРС,*

зараженный полевым вирусом, и КРС, вакцинированный маркерной вакциной с делетированным gE (стратегия DIVA).

Требования к вакцинам: Имеются инактивированные и аттенуированные живые вакцины. С кинической точки зрения, вакцины обеспечивают защиту КРС в случае заражения и существенно снижают последующее распространение полевых штаммов вируса. Несмотря на то, что вакцинация может не предотвратить заражение отдельных животных полевым вирусом, распространение вируса дикого типа в инфицированных стадах значительно сокращается. Вакцины не должны индуцировать болезнь, абортирования или какие-либо местные или системные реакции и должны быть генетически стабильными. Маркерные вакцины на основе мутанта с делецией гликопротеина E в настоящее время имеются в продаже (живые или инактивированные) и могут быть использованы в качестве элемента стратегии DIVA.

А. ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / инфекционный пустулезный вульвовагинит (ИР КРС/ ИПВ), вызванный бычьим герпесвирусом 1 (БГВ-1), является заболеванием домашнего и дикого крупного рогатого скота. БГВ-1 принадлежит к роду *Varicellovirus* в подсемействе *Alphaherpesvirinae*, который, в свою очередь, относится к семейству *Herpesviridae* отряда *Herpesvirales*. Вирусный геном состоит из двухцепочечной ДНК, которая кодирует около 70 белков, среди которых были идентифицированы 33 структурных и более 15 неструктурных белков. Вирусные гликопротеины, которые располагаются в оболочке на поверхности вириона, играют важную роль в патогенезе и иммунитете. БГВ-1 можно дифференцировать по подтипам 1.1, 1.2a и 1.2b (Metzler et al., 1985). Подтипы БГВ-1.2 могут быть менее вирулентными, чем подтип 1.1 (Edwards et al., 1990). Ранее именуемый БГВ-1.3, который может выступать в качестве нейропатогенного агента у телят, повторно классифицировали как БГВ-5 (Magyar et al., 1993). БГВ-1 имеет сходные антигенные и генетические характеристики с другими альфагерпесвирусами жвачных животных: БГВ-5, козий герпесвирус 1, герпесвирус 1 оленей (благородный олень), герпесвирус 2 оленей (северный олень), герпесвирус 1 североафриканской антилопы и герпесвирус 1 лосей (Thiry et al. 2006).

После инкубационного периода, составляющего в 2-4 дня, появляются серозные выделения из носа, слюнотечение, лихорадка, отсутствие аппетита и депрессия. Через несколько дней выделения из носа и глаз становятся слизисто-гнойными. Там, где практикуется естественное спаривание, генитальная инфекция может привести к возникновению пустулезного вульвовагинита или баланопостита. Однако большинство инфекций протекают в умеренной или субклинической форме (Van Oirschot et al., 1993). Неосложненные случаи респираторного или генитального заболевания, вызываемые БГВ-1, продолжаются примерно 5-10 дней. Вторичные бактериальные или вирусные возбудители могут способствовать возникновению комплекса болезней, приводящего к развитию тяжелой формы респираторной болезни у молодых животных («транспортная» или «стадная» лихорадка).

После заражения воздушным путем БГВ-1 реплицируется до высоких титров в мембранах слизистых оболочек верхних дыхательных путей и в миндалинах. Затем вирус распространяется на конъюнктивы и достигает тригеминальных узлов путем переноса нейронных аксонов. После генитальной инфекции БГВ-1 реплицируется в мембранах слизистых оболочек влагалища или препуция и становится латентным в крестцовых узлах. Вирусная ДНК сохраняется в нейронах ганглиев, вероятно, в течение всей жизни носителя (латентное состояние). Стресс, такой как транспортировка и роды, а также применение кортикостероидов, может вызвать реактивацию латентной инфекции. Следовательно, вирус может переключаться между латентной и литической инфекцией и периодически выделяться в окружающую среду и распространяться на контактных животных.

Инфекция БГВ-1 вызывает образование антител и клеточно-опосредованную иммунную реакцию в течение 7-14 дней. Предполагается, что иммунный ответ сохраняется в течение всей жизни, хотя через несколько лет она может снизиться до уровня ниже предела обнаружения в некоторых тестах. Материнские антитела передаются через молоко теленку, который, таким образом защищен от клинических проявлений болезни, вызываемой БГВ-1 (Mechor et al., 1987). Биологический период полураспада материнских антител составляет около 3 недель, однако в отдельных случаях они могут быть обнаружены у животных в течение нескольких месяцев.

Вирус распространен по всему миру, за исключением стран, свободных от БГВ-1, соразмерно распространению домашнего скота. Другие *Artiodactyla* (такие как козы, овцы, водные буйволы, верблюды) могут быть инфицированы БГВ-1. После заражения назальные вирусные выделения наблюдаются в течение 5-14 дней с пиковыми титрами 10^8 - 10^{10} TCID₅₀ (50% инфекционных доз в тканевой культуре) на 1 мл назального секрета. Сперма инфицированного быка может содержать БГВ-1, и вирус, таким образом, может быть передан при естественном спаривании и искусственном осеменении (Parsonson & Snowdon, 1975).

Вакцины обычно препятствуют развитию клинических признаков и значительно уменьшают распространение вируса после инфицирования, но не полностью предотвращают инфекцию. В разных странах проводились или в настоящее время проводится ряд кампаний по ликвидации болезни, включая программы тестирования и удаления или кампании по вакцинации (см. Раздел С).

Предположение о наличии заражения БГВ-1 может быть сделано на основании клинических, патологических и эпидемиологических данных. Однако для постановки определенного диагноза необходимо проведение лабораторных обследований (серологические исследования или выявление вируса). Полная диагностическая процедура в лаборатории направлена на обнаружение причинного вируса (или компонентов вируса) и специфических антител, которые они индуцируют. Тем не менее, в силу латентного статуса инфекции, вызываемой БГВ-1, выявления антител может быть достаточно для определения статуса БГВ-1 у отдельных животных.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1. Методы исследований для диагностики БГВ-1 и их цели

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных до перемещения	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Определение возбудителя ¹						
Выделение вируса	-	+ ²	+	++	-	-
ПЦР в реальном времени	-	+ ²	+	+++	-	-
Определение иммунной реакции						
ИФА	+++	+++	+++	++	+++	+++
VN	++	++	++	+	++	++

¹ Рекомендуется сочетание методов идентификации возбудителей, применяемых для одного и того же клинического образца

² Метод, применимый при исследовании спермы

Обозначения: +++ = рекомендованный метод, валидированный для указанной цели; ++ = подходящий метод, имеются недостатки или ограничения; + = может быть использован в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или иные факторы значительно ограничивают его применение; – = не подходит для данной цели
PCR = полимеразная цепная реакция; ИФА = иммуноферментный анализ; VN = реакция вируснейтрализации.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Отбор и обработка образцов

Назальные смывы, предпочтительно отобранные пенными или флокированными тампонами, собирают от нескольких (от пяти до десяти) пораженных особей крупного рогатого скота (КРС) на ранней стадии заражения. У данного КРС должны быть серозные, а не слизисто-гнойные назальные выделения. В случаях вульвовагинита или баланопостита смывы берутся из гениталий. Смывы собирают путем интенсивного обтирания поверхности слизистых оболочек. Препуций также обмывают физраствором; затем собирают смывы. Образцы суспендируют в транспортной среде (среда культур клеток с антибиотиками и 2-10% фетальной бычьей сывороткой, свободной от БГВ-1, для предотвращения инактивации вируса), охлаждают при 4°C и оперативно направляют в лабораторию.

В ходе аутопсии для выделения вируса берут образцы слизистых оболочек дыхательных путей и миндалин, легких и бронхиальных лимфатических узлов. В случаях абортирования исследуют ткани печени, легких, селезенки, почек и плацентарных котиледонов. Образцы следует хранить на льду и отправлять в лабораторию в кратчайшие сроки.

После доставки в лабораторию мазки взбалтывают при комнатной температуре в течение 30 минут в транспортной среде для элюирования вируса. После удаления тампонов транспортную среду осветляют центрифугированием при 1500g в течение 10 минут. Ткани гомогенизируют до получения 10-20% (масса / объем) суспензии в клеточной культуральной среде до центрифугирования при 1500g в течение 10 минут. Надосадочную жидкость таких образцов фильтруют через 0,45 мкм фильтры и используют для выделения вируса.

Для выделения вируса из спермы необходимы некоторые специальные приспособления, поскольку семенная жидкость содержит ферменты и другие факторы, являющиеся токсичными для клеток, которые ингибируют репликацию вируса (см. ниже).

1.2. Выделение вируса

Для выделения вируса используют бычьи клетки различного происхождения. Первичные или вторичные клетки почек, легких или тестикул КРС, клеточные штаммы, полученные из ткани легких эмбрионов КРС, носовых раковин или трахей, и сформированные клеточные линии, такие как линия клеток Мадин-Дарби почки (MDBK), пригодны для размножения БГВ-1.

Культуры клеток можно выращивать в стеклянных или пластиковых пробирках, на планшетах или в чашках. При использовании 24-луночных пластиковых планшетов, 100-200 мкл объема надосадочной жидкости, описанной выше, инокулируют в данные клеточные культуры. После адсорбции в течение 1 часа, культуры промывают и добавляют поддерживающую среду. Сыворотка, используемая в качестве добавки к поддерживающей среде, не должна содержать антитела к БГВ-1. Культуры клеток наблюдают ежедневно для выявления цитопатического действия (ЦПД), которое обычно проявляется в течение 3 дней после инокуляции. Оно характеризуется образованием гроздеподобных скоплений

округлых клеток вокруг отверстия в монослое; иногда наблюдаются гигантские клетки с несколькими ядрами. Умение отличать такой характерный внешний вид требует опыта. Если через 7 дней ЦПД не проявляется, осуществляют слепой пассаж. Культуру клеток замораживают-оттаивают и освещают центрифугированием, а надосадочную жидкость используют для инокуляции свежеприготовленных монослоев (Brunner et al., 1988; Edwards et al., 1983).

Для идентификации восстановленного вируса как БГВ-1, надосадочную жидкость культуры нейтрализуют моноспецифической антисывороткой БГВ-1 или нейтрализующим моноклональным антителом (МАт). Для этого проводят серию десятикратных разведений исследуемой надосадочной жидкости и к каждому раствору добавляют моноспецифическую антисыворотку БГВ-1 или отрицательную контрольную сыворотку. После инкубации при 37°C в течение 1 часа, смеси инокулируют в клеточные культуры. Через 3-5 дней рассчитывают индекс нейтрализации. Индекс нейтрализации представляет собой титр вируса (в \log_{10}) в присутствии отрицательной контрольной сыворотки минус титр вируса в присутствии специфической антисыворотки. Если индекс нейтрализации превышает 1,5, изолят считают БГВ-1. Для сокращения процедуры выделения вируса два образца инокулируют в клеточную культуру: сыворотку, предварительно инкубированную моноспецифической антисывороткой, и сыворотку, предварительно инкубированную отрицательной контрольной сывороткой. Если ЦПД ингибируется моноспецифической антисывороткой, изолят считают БГВ-1, хотя для окончательного подтверждения потребуется молекулярная характеристика для дифференцирования его от родственных альфагерпесвирусов жвачных.

Альтернативным методом идентификации вируса является прямая проверка антигена БГВ-1 в клетках вокруг ЦПД с помощью реакции иммунофлуоресценции или иммунопероксидазного анализа (Kaashoek et al., 1994) с конъюгированной моноспецифической антисывороткой или МАт. Кроме того, надосадочную жидкость используют в качестве матрицы для полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с использованием эндонуклеазы (RFLP) (см. Раздел В.1.4) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см. Раздел В.1.3).

1.2.1. Выделение вируса из спермы

В клеточной культуре двумя пассажами исследуют от 0,05 до 0,1 мл свежееотобранной спермы. Свежееотобранная сперма обычно является цитотоксичной и подлежит предварительному разведению (например, 1/10) перед добавлением в клеточные культуры. Подобная проблема может возникать иногда с разбавленной спермой. В случае разбавленной спермы необходимо провести аппроксимацию, чтобы убедиться, что исследуется эквивалент свежееотобранной спермы не менее 0,1 мл (например, не менее 0,5 мл разбавленной спермы). Может потребоваться проведение тестирования нескольких разведенных образцов с помощью этой процедуры, чтобы достичь объема, эквивалентного 0,1 мл свежееотобранной спермы (например, 5×1 мл 1/10 разбавленного образца спермы). Ниже приведена соответствующая процедура исследования. См. также Brunner et al. (1988).

1.2.1.1. Процедура исследования

- i) Разводят 200 мкл свежееотобранной спермы в 2 мл фетальной бычьей сыворотки (без антител к БГВ-1) с антибиотиками.
- ii) Энергично смешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре.
- iii) Инокулируют 1 мл смеси сперма / сыворотка в монослой восприимчивых

клеток (см. выделение вируса выше) в 6-луночном планшете для культивирования тканей.

- iv) Инкубируют планшеты в течение 1 часа при 37°C.
- v) Смесь удаляют, монослой дважды промывают 5 мл поддерживающей среды и добавляют 5 мл поддерживающей среды в каждую лунку.
- vi) В исследование включают отрицательные и положительные контроли БГВ-1. Необходимо соблюдать особую осторожность, во избежание случайной контаминации исследуемых лунок положительным контролем, например, путем использования контроля в последнюю очередь и использования отдельных планшетов.
- vii) Планшеты ежедневно исследуют под микроскопом для выявления ЦПЭ. В случае появления ЦПД проводят подтверждающие исследования на БГВ-1 с помощью специфических методов нейтрализации или иммунного мечения (см. выше).
- viii) В случае если ЦПД не проявляется через 7 дней, культуры замораживают и оттаивают, осветляют центрифугированием и надсадочную жидкость используют для инокуляции свежеприготовленных монослоев.
- ix) Образец считают отрицательным, если ЦПД не проявляется через 7 дней инкубации пассированных культур.

1.3. Обнаружение нуклеиновой кислоты

В течение последнего десятилетия были описаны различные методы обнаружения ДНК БГВ-1 в клинических образцах, включая гибридизацию ДНК-ДНК и ПЦР. ПЦР все чаще используется в рутинной диагностике (Moore et al., 2000). По сравнению с выделением вируса, ПЦР имеет основные преимущества: большая чувствительность и быстрота: ее можно выполнить в течение 1-2 дней. Также можно обнаружить эписомальную ДНК нереплицирующего вируса в чувствительных узлах (Van Engelenburg et al., 1993), таких как тригеминальные ганглии, в латентной фазе заражения. Недостатком является то, что ПЦР-анализы подвержены контаминации и поэтому необходимо принять меры предосторожности с целью предотвращения ложноположительных результатов. Риск контаминации заметно снижается благодаря новым методам ПЦР, таким как количественная ПЦР в реальном времени (см. ниже) (Abril et al., 2004; Lovato et al., 2003; Wernike et al., 2011), метод ПЦР рекомендуется во всех случаях для прямого обнаружения БГВ-1.

До сих пор ПЦР использовали в основном для обнаружения ДНК БГВ-1 в искусственным (Kramps et al., 1993) или естественным образом (Van Engelenburg et al., 1993) инфицированных образцах спермы. Важно тщательно оптимизировать условия ПЦР, включая подготовку образцов, концентрацию контрольных компонентов, таких как праймеры и полимеразы, а также циклических программ. Целевая область амплификации должна присутствовать во всех штаммах БГВ-1, и ее нуклеотидная последовательность должна быть сохранена. Гены ТК, gB, gC, gD и гЭ были использованы в качестве целей для ПЦР-амплификации. Кроме того, ПЦР, основанные на обнаружении gE-последовательностей, могут быть использованы для дифференцирования вирусов дикого типа и штаммов вакцин, с deletированным gE (Fuchs et al., 1999; Schynts et al., 1999; Wernike et al., 2011). Распознавание заражения вирулентными штаммами ИРКРС от заражения живыми аттенуированными (немаркерными) штаммами непросто добиться с помощью

метода ПЦР, и для этой цели используют RFLP или секвенирование высокой производительности (HTS). Разработаны специфические ПЦР, способные различать БГВ-1, БГВ-5 и другие родственные альфагерпесвирусы (Ashbaugh et al., 1997; Ros et al., 1999).

В ходе экспериментов было обнаружено, что ПЦР является более точной, по сравнению с методом выделения вируса: в образцах разбавленной яичным желтком спермы, полученной от экспериментально зараженных быков, методом ПЦР было выявлено в пять раз больше положительных результатов, чем методом выделения вируса (Van Engelenburg et al., 1995). Предел обнаружения валидированных ПЦР составляет всего несколько копий генома на одну реакцию ПЦР. Тем не менее, ложноотрицательные результаты не могут быть исключены. Для идентификации возможных ложноотрицательных результатов, рекомендуется поместить матрицу внутреннего контроля в реакционную пробирку с образцом спермы для амплификации теми же праймерами. Такую контрольную матрицу можно сконструировать путем введения, например, фрагмента из 100 базовых пар в целевую область. Такая контрольная матрица также позволяет наполовину определить количество обнаруженной ДНК (Ros et al., 1999; Van Engelenburg et al., 1993). При использовании внутреннего контроля необходимо провести всестороннее исследование, чтобы убедиться, что ПЦР-амплификация добавленного внутреннего контроля не конкурирует с диагностической ПЦР и, таким образом, снижает аналитическую чувствительность (см. также главу 1.1.6. Принципы и методы проверки диагностических тестов на инфекционные заболевания). Выделение ДНК и качество ДНК-препаратов также контролируют путем амплификации клеточных последовательностей (конститутивные гены, Wernike et al., 2011) или путем добавления «искусственных» последовательностей ДНК до проведения экстрагирования (например, ген зеленого флуоресцентного белка, вирусы, не связанные с БГВ) в качестве внутренних контролей. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР в отношении БГВ-1 используют ПЦР-системы в реальном времени.

1.3.1. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для обнаружения БГВ-1 в разбавленной бычьей сперме, предназначенной для продажи, был разработан следующий метод ПЦР в реальном времени. Этот метод валидирован в соответствии с главой 1.1.6 и включает всестороннее международное межлабораторное сравнение шести сотрудничающих лабораторий, имеющих специальный статус при проведении исследований в отношении ИРКРС (Wang et al., 2008).

Ряд исследований показал, что методы ПЦР более чувствительны, по сравнению с методом выделения вируса (Smits et al., 2000; Van Engelenburg et al., 1995; Vilcek et al., 1994; Wang et al., 2008; Wiedmann et al., 1993). ПЦР в реальном времени использовали для выявления БГВ-1 и БГВ-5 у экспериментально зараженных особей КРС и мышей (Abril et al., 2004; Lovato et al., 2003), а серию традиционных ПЦР использовали для выявления ДНК БГВ-1 в искусственным или естественным образом инфицированных образцах спермы КРС (Deka et al., 2005; Grom et al., 2006; Masri et al., 1996; Van Engelenburg et al., 1993; Weiblen et al. 1992; Wiedmann et al., 1993; Xia et al., 1995). Традиционное выявление амплифицированных продуктов ПЦР основано на гель-электрофорезном анализе (Rola et al., 2003). Праймеры, специфичные для последовательностей, выбрали для амплификации различных частей консервативных гликопротеиновых генов генома БГВ-1, включая ген гликопротеина В (gB) (Grom et al., 2006; Santurde et al., 1996), gC-ген (Smits et al., 2000; Van Engelenburg et al., 1995), gD-ген (Smits et al., 2000; Wiedmann et al., 1993), ген gE (Grom et al., 2006) и ген тимидинкиназа (tk) (Moore et al., 2000; Yason et al., 1995). Кроме того, триплексная ПЦР в реальном времени для выявления генов gD и gE БГВ-1 вместе с

конститутивным геном была валидирована и опубликована в 2011 году (Wernike et al., 2011). Такая ПЦР также позволяет легко и быстро дифференцировать полевые штаммы БГВ-1 и вакцинные штаммы с делетированным gE.

В описанной в данной главе ПЦР в реальном времени используют пару праймеров, специфичных для последовательностей, с целью амплификации ДНК-мишени и 5'-нуклеазного олигонуклеотида для выявления амплифицированных продуктов. Олигонуклеотид представляет собой одинарный специфичный для последовательности олигонуклеотид, меченный двумя различными флуорофорами: репортерным /донорным 5-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM) на 5'-конце и акцепторным / гасящим 6-карбокситетраметилбродамином (TAMRA) на 3'-конце. Данный метод ПЦР в реальном времени предназначен для выявления вирусной ДНК всех штаммов БГВ-1, включая подтипы 1 и 2, в разбавленной бычьей сперме. Анализ избирательно амплифицирует 97-парную последовательность гена гликопротеина В (gB). Подробная информация о праймерах и зондах приведены в протоколе ниже.

1.3.1.1. Подготовка образцов, оборудование и реактивы

- i) Образцы, используемые в исследовании, обычно представляют собой разбавленную бычью сперму, хранящуюся в жидком азоте. Образцы спермы транспортируют в лабораторию в жидком азоте или отгружают при 4°C и хранят в жидком азоте или при -70°C (при длительном хранении) или 4°C (при кратковременном хранении). Хранение спермы при 4°C в течение короткого периода (до 7 дней) не влияет на результат ПЦР.
- ii) Обрабатывают по три соломинки из каждой партии спермы. Для каждого ДНК-препарата проводят дуплексные ПЦР-амплификации (всего шесть амплификаций) для выявления ДНК в образцах с низким содержанием вируса.
- iii) Описанный в данной главе анализ ПЦР в реальном времени состоит из двух отдельных процедур. Во-первых, ДНК БГВ-1 экстрагируют из спермы с использованием хелатирующей смолы Chelex-100, протеиназой К и DL-дитиотрейтолом (DTT). Вторая процедура - это ПЦР-анализ экстрагированной ДНК-матрицы в реакционной смеси ПЦР в реальном времени. Доступен ряд коммерческих наборов для ПЦР-амплификации в реальном времени, и любой выбранный набор должен быть совместим с выбранной платформой PCR в реальном времени. Необходимые праймеры и зонды могут быть синтезированы различными коммерческими компаниями.

1.3.1.2. Экстракция ДНК

- i) В 1,5 мл пробирку с завинчивающейся крышкой, добавляют:

Chelex 100 натрий	
(10% масса /объем в дистиллированной деионизированной воде)	100 мкл
Протеиназу К (10 мг / мл)	11,5 мкл
DL-дитиотрейтол (1 М)	7,5 мкл
Безнуклеазную воду	90 мкл
Образец спермы	10 мкл

Аккуратно перемешивают пипетированием³.

- ii) Образцы инкубируют при 56°C в течение 30 минут и затем перемешивают на вортексе при высокой скорости в течение 10 секунд.
- iii) Затем пробирки инкубируют на водяной бане в течение 8 минут, перемешивают на вортексе при высокой скорости в течение 10 секунд.
- iv) Пробирки центрифугируют при 10000 g в течение 3 минут.
- v) Надосадочную жидкость⁴ переносят в новую микропробирку и используют непосредственно для ПЦР или хранят при -20°C.

1.3.1.3. Приготовление реактивов

Следует соблюдать инструкции изготовителя в отношении использования и хранения реакционной смеси ПЦР в реальном времени.

Рабочие базовые растворы для праймеров и зондов изготовлены с использованием безнуклеазной воды в концентрации 4,5 мкМ и 3 мкМ соответственно. Базовые растворы хранят при -20°C, и зондовый раствор хранят в темноте. Одноразовые аликвоты могут быть приготовлены для ограничения замораживания-оттаивания праймеров и зондов и для продления их срока годности.

1.3.1.4. Процедура ПЦР в реальном времени

- i) *Праймеры и последовательности зондов*

Выбор праймеров и зонда описан у Abril et al. (2004) и приведен ниже.

Праймер gB-F: 5'-TGT-GGA-CCT-AAA-CCT-CAC-GGT-3' (позиция 57499–57519 GenBank®, номер доступа AJ004801)

Праймер gB-R: 5'-GTA-GTC-GAG-CAG-ACC-CGT-GTC-3' (позиция 57595–57575 GenBank®, номер доступа AJ004801)

Маркированный зонд: 5'-FAM-AGG-ACC-GCG-AGT-TCT-TGC-CGC-TAMRA-3' (позиция 57525–57545 GenBank®, номер доступа AJ004801)

- i) *Подготовка реакционных смесей*

Реакционные смеси для ПЦР готовят в отдельной лабораторной комнате. Для каждой ПЦР включают соответствующие контроли. Как минимум, следует включать контроль без матрицы (NTC, только реактивы), соответствующие отрицательные контроли, то есть 1 на 10 исследуемых образцов и два положительных контроля (умеренный и слабый положительный). Каждый исследуемый образец и контроль тестируют в двух экземплярах. ПЦР-амплификации проводят в объеме 25 мкл.

- a) Реакционные смеси для ПЦР доставляют в чистое помещение (свободное от вирусных культур, экстрактов ДНК или постаплификационных продуктов)

³ Важно, чтобы раствор Chelex 100 был однородным при пипетировании, так как натрий Chelex 100 не растворяется. Этого можно добиться путем помещения сосуда с раствором Chelex-100 на магнитную мешалку во время пипетирования.

⁴ Некоторые образцы ДНК могут помутнеть, и в отдельных случаях после замораживания и оттаивания может появляться тонкая белая пленка. Вероятно это не влияет на производительность ПЦР. Необходимость нагревания или повторного центрифугирования образцов отсутствует.

2 × реакционная смесь для ПЦР в реальном времени	12,5 мкл
Краситель ROX (по желанию)	0,5 мкл
Прямой праймер (gB-F, 4,5 мкМ)	1 мкл
Обратный праймер (gB-R, 4,5 мкМ)	1 мкл
Зонд (3 мкМ)	1 мкл
Безнуклеазная вода	4 мкл

b) 5 мкл ДНК-матрицы добавляют в смесь реактивов для ПЦР до конечного объема 25 мкл. Образцы ДНК готовят и добавляют к смеси для ПЦР в отдельной комнате.

ii) Полимеразная цепная реакция в реальном времени
Пробирки для ПЦР помещают в анализатор ПЦР в реальном времени в отдельной, предназначенной для проведения ПЦР, комнате. ПЦР-анализатор запрограммирован для исследования следующим образом:

Параметры реакции ПЦР (могут различаться в зависимости от различных платформ ПЦР)

Один цикл:	Выдерживать при 50°C	2 минуты
Один цикл:	Выдерживать при 95°C	2 минуты
45 циклов:	Выдерживать при 95°C	15 секунд
	Выдерживать при 60°C	45 секунд

iii) Анализ данных ПЦР в реальном времени
Пороговый уровень обычно устанавливается в соответствии с инструкциями изготовителя для выбранного программного обеспечения для проведения анализа. В качестве альтернативы, образцы спермы с отрицательным результатом в отношении вируса, полученные от серонегативных животных, можно тестировать параллельно с целью определения фонового сигнала, связанного с используемой системой выявления.

1.3.1.5. Интерпретация результатов

- i) Контроли
Положительный и отрицательный контроли, а также контроль реактивов должны быть включены в каждый тест ПЦР. Отрицательная сперма, полученная от сероотрицательных быков, может использоваться в качестве отрицательного контроля. Положительная сперма, полученная от естественным образом инфицированных быков, является предпочтительным положительным контролем. Однако могут возникать сложности с ее получением. В качестве альтернативы, положительный контроль можно получить из отрицательной спермы, связанной с определенными количествами вируса БГВ-1.
- ii) Результаты теста
Положительный результат: любой образец, имеющий пороговое значение цикла (Ct), равное 45 или ниже, связанное с кривой амплификации, считают положительным. Положительный контроль должен иметь значение Ct в допустимом диапазоне (± 3 Ct), как было определено ранее методом исследования сходимости. Чтобы свести к минимуму риск контаминации положительным контролем, используют разведение, обеспечивающее значение Ct от 30 до 33.
Отрицательный результат: Любой образец, который не показывает значения Ct, считается отрицательным. Отрицательный контроль и контроль матрицы не должны иметь значений Ct.

1.4. Выявление вирусного антигена

Назальные, конъюнктивальные смывы или смывы со слизистой оболочки гениталий помещают непосредственно на покровное стекло, или после центрифугирования клеточный осадок (см. раздел В. 1.1) точно наносят на покровные стекла. Данные покровные стекла подвергают стандартной реакции прямой или непрямой иммунофлуоресценции. При прямой реакции иммунофлуоресценции моноспецифическая антисыворотка конъюгируется с флуоресцентным красителем, например, флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC), тогда как в непрямой реакции вторичное антитело анти-видавого иммуноглобулина конъюгируется с флуорохромом. Для получения достоверных результатов, необходимо отобрать несколько животных в стаде, у которых наблюдаются симптомы лихорадки и незначительные серозные выделения из носа. Смывы высушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне. Назальные смывы, полученные от КРС с гнойными или геморрагическими назальными выделениями, часто отрицательные (Terpstra, 1979). Преимущество данного метода выявления антигена состоит в том, что он обеспечивает постановку диагноза в тот же день. Однако чувствительность данной процедуры ниже, чем чувствительность метода выделения вируса (Edwards et al., 1983) или ПЦР. Положительные и отрицательные контроли следует включать в каждое исследование.

Ткани, собранные в ходе аутопсии, могут быть исследованы на присутствие антигена БГВ-1 с помощью иммунофлуоресцентного анализа замороженных срезов. Иммуногистохимические исследования также можно проводить для выявления БГВ-1 и определения места расположения антигена в тканях. МАт все чаще используют для выявления антигена БГВ-1, что приводит к увеличению специфичности теста. Однако такие МАт должны быть тщательно отобраны, так как они должны быть направлены против консервативных антигенных детерминант, которые присутствуют на всех изолятах БГВ-1.

Другой возможностью прямого и быстрого выявления вирусного антигена является использование иммуноферментного анализа (ИФА). МАт или поликлональные антитела, нанесенные на твердую фазу, обычно на микропланшете, захватывают антиген. Для получения надежных положительных результатов необходимо количество антигенов, эквивалентное 10^4 - 10^5 TCID₅₀ БГВ-1 (Collins et al., 1988). Эти значения не могут быть чрезвычайно высокими, так как титры 10^8 - 10^9 TCID₅₀ / мл назальной жидкости могут быть выделены КРС через 3-5 дней после заражения БГВ-1. Чувствительность может быть увеличена путем использования систем амплификации (см. Edwards & Gitao, 1987).

В отличие от выделения вируса, для методов прямого выявления антигенов не требуются средства для культивирования клеток, и лабораторный диагноз может быть поставлен в течение 1 дня. Недостатками являются более низкая чувствительность метода прямого выявления антигена и необходимость дополнительного выделения вируса, в случае если изолят требуется для проведения дальнейших исследований.

Таким образом, ПЦР в реальном времени является самым современным стандартом, и выявление антигена должно использоваться только в том случае, если другие методы недоступны.

1.5. Дифференцирование подтипов бычьих герпесвирусов 1 и альфагерпесвирусов жвачных животных, связанных с бычьим герпесвирусом 1

Подтип 1 и подтип 2b БГВ-1 можно дифференцировать путем использования

соответствующих МАт в реакциях иммунофлуоресценции, радиоиммунопреципитации, иммунопероксидазной реакции или иммуноблоттинге (Rijsewijk et al., 1999; Wyler et al., 1989). Рестрикционное эндонуклеазное расщепление молекул вирусной ДНК позволяет дифференцировать подтипы БГВ-1. Анализ RFLP включает экстракцию ДНК из вирионов или инфицированных клеток, расщепление выделенной ДНК рестрикционными эндонуклеазами и отделение полученных фрагментов электрофорезом в агаровом геле. Дифференцирование подтипов 1, 2a и 2b БГВ-1 путем расщепления эндонуклеазой HindIII основано на молекулярной массе трех соответствующих фрагментов ДНК (I, K и L) (Metzler et al., 1985). Методы RFLP имеют ограниченную диагностическую ценность, однако могут быть полезны при проведении эпидемиологических исследований. Кроме того, модель RFLP изолятов вирусов может быть сравнима с моделью живых вакцинных штаммов.

При необходимости дифференцирования антигенных и генетически связанных альфагерпесвирусов (БГВ-1, БГВ-5, козий герпес 1, олений герпесвирус 1 и 2, герпесвирус 1 лосей, герпесвирус 1 североафриканской антилопы), имеются усовершенствованные методы с использованием моноклональных антител (Keuser et al., 2004) или ПЦР-амплификации и секвенирования (Ros et al., 1999).

Методы HTS также могут использоваться для выявления целого генома БГВ-1 и сравнения различных штаммов, ответственных за вспышку болезни. HTS, вероятно, будет использоваться более регулярно, благодаря усовершенствованным технологиям и протоколам. Для оптимизации результатов титр вируса должен быть как можно выше, а очищенные вирусные препараты должны позволять получать наилучшие результаты секвенирования. См. также главу 1.1.7. *Стандарты высокопроизводительного секвенирования, биоинформатики и вычислительной геномики.*

1.6. Интерпретация результатов

Выделение БГВ-1 у больного животного не означает, что данный вирус является причиной болезни. Это может быть, например, латентный вирус, который был реактивирован вследствие стресса. Подтверждающая диагностика в условиях лаборатории должна проводиться для группы животных и сопровождаться сероконверсией от отрицательной до положительной или четырехкратным или более высоким титром антител, специфичных для антител БГВ-1. Парные образцы сыворотки, собранные с интервалом в 3-4 недели, исследуют путем серологического исследования на наличие специфических антител (см. Раздел В.2).

2. Серологические исследования

Серологические исследования используют для достижения нескольких целей:

- i) Диагностика острой инфекции: парные образцы сыворотки одного и того же животного на острой стадии заражения и на стадии выздоровления исследуют в рамках одного теста. Сероконверсия от отрицательной до положительной, четырехкратная или с более высоким уровнем титров антител, свидетельствует об острой инфекции.
- ii) Подтверждение отсутствия инфекции, например, для целей международной торговли.
- iii) Определение превалентности инфекции в сероэпидемиологических исследованиях.

- iv) Поддержание программы искоренения и последующий надзор.
- v) В исследовательских целях, например, для оценки иммунного ответа после вакцинации и контрольного заражения.

Реакции вируснейтрализации (VN) (Bitsch, 1978) и различные ИФА (Kramps et al., 1993) обычно используют для выявления антител к БГВ-1 в сыворотке. Поскольку латентность вируса является нормальным следствием заражения БГВ-1, идентификация серологически положительных животных является полезным и надежным показателем статуса инфекции. Любое животное, имеющее антитела к вирусу, считается носителем и потенциальным вирусоносителем. Единственными исключениями являются телята, которые приобрели пассивные колостральные антитела от матери, и неинфицированный КРС, вакцинированный инактивированными вакцинами. Сообщалось, что в экспериментальных условиях телята, инфицированные под действием материнского иммунитета, могут быть серологически отрицательными, являясь носителями реактивируемой латентной инфекции (Lemaire et al., 2000)).

В целом, серологические исследования на БГВ-1 можно разделить на традиционные и маркерные. До сих пор единственными доступными серологическими маркерными тестами были ИФА, блокирующие антитела к gE БГВ-1 (Van Oirschot et al., 1997). Животных, вакцинированных маркерными вакцинами с deletированным gE, можно дифференцировать от инфицированных полевыми вирусами животных, благодаря отрицательной серологической реакции на gE. Что касается традиционной серологии, то могут использоваться реакция вируснейтрализации, ИФА, блокирующие антитела к gE БГВ-1, или непрямые ИФА.

Для выявления антител в образцах молока (объемных пробах), в основном, используют ИФА, включая gE-ИФА (Wellenberg et al., 1998a), но с некоторыми ограничениями. При исследовании объемных проб молока положительная gE-специфичная реакция указывает на присутствие нескольких инфицированных животных в стаде (Frankena et al., 1997). Блокирующая gE ИФА дает положительную реакцию в объемной пробе молока только тогда, когда инфицировано более 10-15% стада (Wellenberg et al., 1998b), хотя чувствительность может быть увеличена с помощью протоколов концентрирования молока (Schroeder et al., 2012). Следовательно, стадо невозможно признать свободным от заражения БГВ-1 путем проведения таких исследований на основе объемных проб молока или собранных образцов молока. После отрицательного результата исследования методом gE- или gE-ИФА осуществляют сбор образцов крови у каждого животного в стаде. Однако непрямые ИФА, оптимизированные для использования в отношении объемных проб молока, полученного от отдельных коров в количестве до 50 голов (или до 100 голов в зонах, свободных от БГВ-1), могут достоверно определять статус по БГВ-1 этих животных. Данные тест-системы способны обнаруживать один слабopоложительный образец в пуле из 50 образцов молока или один резко-положительный образец молока в пуле из 100 образцов. Для целей общего надзора, исследования объемных проб молока могут дать оценку о превалентности БГВ-1 в стаде, районе или стране (Nylin et al., 2000). Они должны быть дополнены исследованиями сывороток (индивидуальным или объединенным) животных из стад немолочных пород. Для контроля статуса БГВ-1 в молочных стадах объемные пробы молока от животных в количестве от 50 голов (или до 100 в регионах, свободных от БГВ-1) животных следует исследовать 3-4 раза в год с использованием подходящего непрямого ИФА. В стадах, состоящих из более чем 50 животных (или 100 животных в регионах, свободных от БГВ-1), исследуют несколько объемных проб молока. Положительные результаты исследования объемных проб молока подтверждают путем анализа отдельных образцов крови или молока всех животных, участвовавших в сборе объемной пробы с положительным результатом теста.

В объемном исследовании оценивали тесты на выявление антител, которые традиционно использовались в национальных референтных лабораториях в Европе (Kramps et al., 2004). В данном исследовании приняли участие 12 референтных лабораторий из 12 европейских

стран. Пятьдесят три образца сывороток и 13 образцов молока из нескольких стран, были закодированы и отправлены в двух экземплярах участвующим лабораториям. Образцы сывороток включали три европейских контрольных сыворотки EU1 (антитело-положительная), EU2 (антитело-слабоположительная и определенная как пограничный образец) и EU3 (антитело-отрицательная) (Perrin et al., 1994). В то время было сделано заключение, что реакция вируснейтрализации и гВ-специфические ИФА являются наиболее чувствительными тестами для обнаружения антител в сыворотке. Однако современные системы ИФА демонстрируют более высокую чувствительность. По причине очень высокой чувствительности блокирующих гВ ИФА, слабоположительный результат на гВ-антитела часто не может быть подтвержден альтернативными тест-системами (непрямой ИФА, реакция вируснейтрализации). В настоящее время разработаны непрямые ИФА для БГВ-1, которые также очень чувствительны и специфичны. Результаты этих ИФА сравнимы с результатами, полученными с использованием гВ-блокирующих ИФА (Beer et al., 2003).

Методы гЕ-ИФА менее чувствительны и специфичны, чем обычные тест-системы. Кроме того, сероконверсия против гЕ может происходить с задержкой, особенно у вакцинированных животных, и часто не обнаруживается до 21 - 35 дня после заражения. В настоящее время доступно не менее трех различных коммерческих систем гЕ-ИФА, позволяющих анализировать образцы с различными гЕ-ИФА, каждая из которых обладает уникальными характеристиками.

2.1. Вируснейтрализация

Реакции вируснейтрализации выполняют с различными модификациями. Они различаются в зависимости от штамма вируса, используемого в протоколе испытаний, начального разведения сыворотки, периода инкубации вируса / сыворотки (1-24 часа), типа используемых клеток, дня окончательного считывания и считывания конечной точки (50% к 100%) (Perrin et al., 1993). Среди этих переменных, период инкубации вируса / сыворотки оказывает самое сильное влияние на чувствительность реакции вируснейтрализации. 24-часовой инкубационный период может насчитать до 16-ти раз больше титров антител, чем 1-часовой инкубационный период (Bitsch, 1978), и он рекомендуется в случаях, когда необходимо достичь максимальной чувствительности (например, для целей международной торговли). Различные клетки или клеточные линии КРС пригодны для использования в реакции вируснейтрализации, включая вторичные клетки почки или семенников КРС, штаммы клеток ткани легких или трахеи КРС или установленные клеточные линии MDBK.

2.1.1. Подходящий протокол для реакции вируснейтрализации

- i) Сыворотку, включая контрольные стандартные сыворотки, инактивируют в течение 30 минут на водяной бане при 56°C.
- ii) Готовят двойные разведения тест-сывороток в среде для культивирования клеток. Начинают с неразведенной сыворотки и продолжают до 1/1024 по горизонтали на 96-луночном плоскодонном титрационном микропланшете, не менее трех лунок на каждое разведение и по 50 мкл объема на лунку. В тест также включены разведения положительной контрольной сыворотки и слабоположительных и отрицательных сывороток внутреннего контроля. Дополнительную лунку с неразведенной тест-сывороткой используют для контроля токсичности сывороток.
- iii) Добавляют по 50 мкл посевного БГВ-1 на лунку при разведении в среде

для культивирования клеток, рассчитанном для получения 100-200 TCID₅₀ на лунку. В лунки, предназначенные для контроля токсичности, вместо вируса добавляют по 50 мкл среды для культивирования клеток. Добавляют по 100 мкл среды для культивирования клеток в десять пустых лунок для контролей клеток.

- iv) Производят не менее четырех десятикратных разведений остатка посевного вируса (обратное титрование) в среде для культивирования клеток, используя по 50 мкл на лунку и не менее четырех лунок на одно разведение.
- v) Планшеты инкубируют в течение 24 часов при 37°C.
- vi) Добавляют по 100 мкл клеточной суспензии на лунку при 3×10^4 клеток на лунку.
- vii) Планшеты инкубируют в течение 3-5 дней при 37°C.
- viii) Планшеты изучают на наличие ЦПД под микроскопом. Результат теста подтверждают путем проверки обратного титрования вируса (который должен давать значение 100 TCID₅₀ с допустимым диапазоном 30-300 TCID₅₀), контрольных сывороток и лунок с контролями клеток. Положительная контрольная сыворотка должна давать титр ± 1 двукратного разведения ($\pm 0,3 \log_{10}$ единиц) от целевого значения. Слабоположительная сыворотка должна давать положительный результат. Отрицательная сыворотка не должна давать нейтральный результат (что эквивалентно окончательному разведению 1/2 на стадии нейтрализации). В лунках контролей клеток монослой не должны быть повреждены.
- ix) Результаты тест-сыворотки выражают как обратную величину разведения сыворотки, которая нейтрализует вирус в 50% лунок. Если 50% лунок с неразведенной сывороткой нейтрализуют вирус, титр (начальное разведение) считают как 1 (1/2 при конечном разведении). Если все лунки с неразведенной сывороткой и 50% лунок с сывороткой, разведенной 1/2, нейтрализуют вирус, титр (начальное разведение) составляет 2 (конечное разведение 1/4). Для получения качественных результатов любую нейтрализацию при титре 1 или выше (исходное разведение) считают положительной. Если в контрольных лунках наблюдается цитотоксичность, образец считается токсичным (без результата), за исключением случаев, когда нейтрализация вируса без цитотоксичности наблюдается при более высоких разведениях, и титр может быть считан однозначно. В тех случаях, когда цитотоксичность сыворотки препятствует интерпретации нейтрализующей активности образца, изменение среды в лунках самых низких двух или трех разведений через 16-24 часа после добавления клеток может устранить цитотоксическое действие.

2.2. Иммуноферментный анализ

ИФА для обнаружения антител против БГВ-1 широко используется, однако стандартная процедура для ИФА не установлена. Несколько типов ИФА являются коммерчески доступными, включая непрямые и блокирующие ИФА, некоторые из которых также подходят для выявления антител в молоке (Kramps et al., 2004). В связи с введением стандартов в стране или штате может быть желательным сравнение качества наборов и проведение тестов на одной партии по ранее определенным критериям в национальной референтной лаборатории, прежде чем они будут использоваться другими лабораториями в стране.

В процедурах проведения ИФА имеется несколько вариантов. Наиболее общими являются: приготовление и покрытие антигена, разведение исследуемого образца, период инкубации антигена и исследуемого образца, раствор субстрата / хромогена. Перед обычным использованием ИФА его валидируют на чувствительность, специфичность и воспроизводимость (см. Главу 1.1.6). Для этой цели исследуют комплексную панель хорошо определяемых (например, реакции вируснейтрализации) резко-положительных, слабopоложительных и отрицательных сывороток. Однако рекомендуется использовать коммерчески доступные ИФА, которые, как было показано, работают лучше, чем самодельные тесты (Kramps et al., 2004).

2.2.1. Непрямой иммуноферментный анализ

Принцип непрямого ИФА основан на связывании специфичных к БГВ-1 антител, присутствующих в исследуемом образце, к иммобилизованному антигену БГВ-1. Связанные антитела выявляют с помощью меченой ферментом противобычьей иммуноглобулиновой антисыворотки. Наличие антител в исследуемом образце приводит к появлению окрашивания после добавления раствора субстрата / хромогена. Этот принцип исследований наиболее подходит для отдельных и смешанных образцов молока.

2.2.2. Блокирующий иммуноферментный анализ

Принцип блокирующего или конкурентного ИФА основан на блокировании связывания меченой ферментом антисыворотки БГВ-1, или анти-БГВ-1 МАт к иммобилизованному антигену антителами в исследуемом образце. Присутствие антител в исследуемом образце приводит к снижению интенсивности окрашивания после добавления раствора субстрата / хромогена. Пример процедуры гВ блокирующего ИФА приведен ниже:

- i) Готовят антиген путем выращивания БГВ-1 в культурах клеток. Когда наблюдается обширное ЦПД, клетки и среду замораживают при -20°C . После оттаивания полученный клеточный лизат центрифугируют в течение 4 часов при $8500g$. Вирусодержащую гранулу суспендируют в небольшом объеме фосфатно-буферного раствора (ФБР), охлаждают на льду и разрушают с помощью ультразвукового дезинтегратора. Препарат антигена затем центрифугируют в течение 10 минут при $800g$ и инактивируют добавлением детергента (конечная концентрация $0,5\%$ Nonidet P 40). Препарат антигена используют при соответствующем разведении для покрытия титрационных микропланшетов. В опубликованной литературе описано множество альтернативных способов получения антигена.
- ii) Титрационные микропланшеты покрывают антигеном, добавляя по 100 мкл разведенного антигена (в $0,05$ М карбонатном буфере, pH $9,6$) в каждую лунку. Планшеты закрывают пленкой, инкубируют при 37°C в течение ночи и хранят при -20°C .

- iii) Перед проведением теста планшеты промывают с использованием 0,05% Tween 80. Добавляют по 100 мкл отрицательной сыворотки (фетальная телячья сыворотка, FCS), по 100 мкл каждого образца сыворотки и по 100 мкл положительной, слабоположительной и отрицательной контрольной сывороток. Обычно образцы сывороток исследуют неразведенными. Планшеты встряхивают, закрывают и инкубируют в течение ночи при 37°C. При подозрении получения ложноположительных реакций (например, при возникновении эпидемиологически неправдоподобных результатов), рекомендуется провести повторное исследование таких сывороток после нагревания в течение 30 минут при 56°C после однократного замораживания-оттаивания.
- iv) Планшеты тщательно промывают пластины и добавляют по 100 мкл конъюгата против БГВ-1-gV-моноклонального антитела / пероксидазы хрена при заданном разведении и повторно инкубируют в течение 1 часа при 37°C. Моноклональные антитела тщательно отбирают в зависимости от его специфичности к gV БГВ-1.
- v) Планшеты промывают, добавляют свежеприготовленный раствор субстрата / хромогена (например, 0,05 М буфера лимонной кислоты, pH 4,5, содержащего 2,2'-азино-бис-[3-этилбензотиазолин] -6-сульфоиклоту [ABTS, 0,55 мг/мл] и 3%-ный раствор свежеприготовленного H₂O₂ [5 мкл / мл]) и инкубируют в течение соответствующего времени (1-2 часа при комнатной температуре).
- vi) Измеряют степень абсорбции планшетов на фотометре для микропланшетов при 405 нм.
- vii) Рассчитывают процент блокировки $[(\text{образец OD}_{\text{FCS}} - \text{OD}_{\text{исслед.образец}}) / \text{OD}_{\text{FCS}} \times 100\%]$ для каждого исследуемого образца.
- vii) Исследуемый образец считают положительным, если процент блокировки составляет 50% и более. Тест считают действительным, если положительные и слабоположительные контрольные сыворотки положительны, а отрицательная контрольная сыворотка реагирует отрицательно. Допустимые пределы контрольных значений и пороговые значения определяются для индивидуального анализа.

2.3. Стандартизация

Каждое серологическое исследование должно включать соответствующие контрольные образцы резко-положительной, слабоположительной и отрицательной сывороток. Научная группа в Европе, созданная группой ветеринаров по искусственному осеменению в ЕС, договорилась об использовании резко-положительной (ЕС1), слабоположительной (ЕС2) и отрицательной (ЕС3) сывороток для стандартизации исследований в отношении БГВ-1 в лабораториях, которые регулярно исследуют образцы, поступающие из центров искусственного осеменения (Perrin et al., 1994). Эти сыворотки были приняты в качестве международных стандартов МЭБ для исследований БГВ-1 и доступны в ограниченных количествах при референтных лабораториях МЭБ для ИРКРС / ИПВ⁵. Исследования, пригодные для сертификации отдельных животных до перемещения (вируснейтрализация или ИФА), должны быть способны оценивать как сильные, так и слабоположительные стандарты (или вторичные национальные стандарты эквивалентной эффективности) как положительные. В силу ограниченности количества сывороток, отвечающих требованиям международного стандарта, необходимо подготовить новую

⁵ FLI, Грайфсвальд-Инсел Римс, Германия и APHA, Вейбридж, Великобритания

расширенную панель контрольных лиофилизированных сывороточных (и молочных) образцов, взятых как от инфицированных, так и от вакцинированных животных. Данная панель должна использоваться для валидации вновь разработанных исследований и согласования исследований между лабораториями. Дополнительные стандартные сыворотки доступны в ограниченных количествах в референтных лабораториях МЭБ (например, R1, R2 и R3 в качестве положительных, слабоположительных и очень слабоположительных стандартных сывороток в референтных лабораториях МЭБ в Германии).

2.4. Неспецифическая реакционная способность БГВ-1-серологии и «псевдо-вакцины»

Следует учитывать неспецифическую реакционную способность сывороток при БГВ-1-ИФА, которая чаще проявляется в маркер-тесте, чем при традиционном серологическом исследовании. Существует несколько причин неспецифических реакций:

- i) Периодическое изменение используемого ИФА;
- ii) Образцы исследовали очень рано после сбора (явление свежести);
- iii) Образцы, исследованные методом gE ИФА, собирали в течение 4 недель после вакцинации маркерной вакциной (явление вакцинации);
- iv) Неудовлетворительное качество образцов (например, гемолизированные образцы).

Поэтому следует рассмотреть следующие меры:

- i) Необходимо провести валидацию каждой исследуемой партии и испытаний для выпуска партии;
- ii) Образцы следует хранить при температуре 4°C и не исследовать ранее, чем через 24-48 часов после отбора проб;
- iii) Образцы должны быть подвергнуты циклу замораживания-оттаивания (-20°C); в некоторых случаях последующая инактивация в тепле (30 минут / 56 °C) позволит исключить неспецифические реакции сывороточных образцов;
- iv) КРС не должен подвергаться серологическим исследованиям на БГВ-1 ранее, чем через 4 недели после какой-либо вакцинации;
- v) gE-ИФАs не должны использоваться для классификации непривитых животных.

В регионах, свободных от ИБР/ИПВ, невосприимчивые особи, продемонстрировавшие положительный результат, иногда обнаруживаются при проведении gB-блокирующих и непрямых ИФА, которые вызывают проблемы, связанные со статусом как животного, так и пораженного стада. Было высказано предположение, что причиной такой перекрестной реакции может быть заражение БГВ-2 (Böttcher et al., 2012). Интересно, что метод gE-ИФА является наиболее доступным серологическим исследованием, специфичным для БГВ-1, и перекрестная реакция с герпесвирусами, не являющимися БГВ-1, очень низка в данных ИФА. Это особенно важно в областях, свободных от БГВ-1, где выявлены одиночные животные с перекрестной реактивностью, что может быть неверно истолковано как заражение стада БГВ-1. Поэтому в свободных регионах для дальнейшей проверки таких положительно прореагировавших животных следует использовать тесты gE-ИФА и вируснейтрализации. Одно из рекомендуемых действий состоит в повторном тестировании таких животных через 28 дней методом gE-ИФА с использованием более низкого порогового значения

(например, положительного / отрицательного = 0,95) для повышения чувствительности. При получении двух отрицательных результатов по gE-ИФА животное не классифицируется как БГВ-1-положительное, однако, рекомендуется забить животное, поскольку могут возникать дополнительные сложности с другими системами исследований (например, положительные результаты объемных проб молока в зараженном стаде).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Предпосылки

1.1. Обоснование и предполагаемое использование продукта

В настоящее время доступно несколько аттенуированных и инактивированных вакцин против БГВ-1. Обычно штаммы вакцины подвергают множественным пассированиям в клеточной культуре. Некоторые штаммы вакцинных вирусов имеют температурно-чувствительный фенотип, то есть они не реплицируются при температуре 39°C или выше. Аттенуированные вакцины вводят интраназально или внутримышечно. Инактивированные вакцины содержат высокие уровни инактивированного вируса или части вирусной частицы (гликопротеины), дополненные адьювантом, для стимуляции адекватного иммунного ответа. Инактивированные вакцины вводят внутримышечно или подкожно. Вакцинацию против БГВ-1 используют для защиты животных от клинических последствий заражения и в качестве содействия программам контроля и искоренения.

В разных странах в настоящее время доступны маркерные вакцины или вакцины DIVA (дифференцирование инфицированных и вакцинированных животных). Данные аттенуированные или инактивированные маркерные вакцины основаны на делеционных мутантах (делеция gE) или на субъединице вириона, например, гликопротеине D. Использование таких маркерных вакцин в сочетании со сравнительными диагностическими исследованиями позволяет дифференцировать зараженный и вакцинированный КРС (DIVA) и лежит в основе программ искоренения БГВ-1 в странах или регионах с высокой превалентностью заражения животных полевым вирусом. Интенсивные программы вакцинации могут снизить превалентность инфицированных животных (Bosch et al., 1998; Mars et al., 2001), которую можно контролировать посредством проведения соответствующих диагностических исследований. В тех случаях, когда это экономически оправданно, оставшиеся инфицированные животные могут быть забиты, в результате чего область становится свободной от БГВ-1. Контроль и искоренение БГВ-1 начались в некоторых странах в начале 1980-х годов. В силу различий уровней превалентности в стадах применялись различные нормативные практики, практики размножения и стратегии искоренения болезни. В настоящее время в ЕС в рамках программ контроля или искоренения болезни продают и используют исключительно DIVA вакцины с делецией gE (как живые, так и убитые).

Рекомендации по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8 «Принципы производства ветеринарных вакцин». Руководящие принципы, приведенные в настоящей главе и в главе 1.1.8, носят общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

2. План производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Вакцину готовят с использованием системы, аналогичной системе партии посевного вируса. Происхождение, история пассирований и условия

хранения исходного посевного вируса (MSV) должны быть регистрации. Тест на идентификацию вируса следует проводить на MSV. Партия посевного вируса содержит штаммы БГВ-1, которые должны быть аттенуированы для получения живого вакцинного штамма. Штаммы могут быть аттенуированы множественными пассированиями в культурах клеток, путем адаптации вируса к росту при низких температурах (чувствительные к температуре мутанты) или генной инженерии, например, путем делеции одного или нескольких вирусных генов (например, гликопротеин Е-1 БГВ-1), которые несущественны для репликации. Должны присутствовать некоторые средства для выделения живого вакцинного вируса из полевых вирусов (например, температурно-специфические шаблоны роста или полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов). Штаммы, используемые для приготовления инактивированных вакцин, не должны быть аттенуированы. Партия посевного вируса должна быть свободной от контаминации.

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

Партию посевного вируса проверяют на отсутствие посторонних вирусов и отсутствие заражения бактериями, грибами или микоплазмой. Из вакцины БГВ-1 следует исключить следующие посторонние вирусы: аденовирус, вирус Акабане, вирус Шмалленберга, коронавирус КРС, бычий герпесвирусы 2, 4 и 5, бычий парвовирус, бычий респираторно-синцитиальный вирус, вирус вирусной диареи КРС (ВВД КРС) и атипичные пестивирусы, бычий ротавирус, вирус коровьей оспы и вирусы болезни Ауески, катаральной лихорадки овец, бычьей однодневной лихорадки, лейкоза КРС, папилломы КРС, папулезного стоматита КРС, коровьей оспы, ящура, нодулярного дерматита, злокачественной катаральной лихорадки, парагриппа 3, бешенства, чумы КРС, и везикулярного стоматита. Поскольку вирус вирусной диареи КРС (ЦПД или не-ЦПД) регулярно обнаруживают в качестве контаминанта вакцин, особое внимание следует уделять отсутствию ВВД КРС. Кроме того, новые атипичные пестивирусы (например, НоВи или НоВи-подобные) должны быть приняты во внимание как возможные контаминанты.

2.2. Способ производства

2.2.1. Процедура

Клетки, используемые для производства вакцины, готовят с использованием системы получения исходного клеточного сырья партиями. Вирус культивируют на установленных клеточных линиях, которые, согласно исследованию, пригодны для производства вакцины, например, клеточные линии Мадин-Дарби почки КРС (MDBK). История клеточной линии должна быть известна. Клеточная линия не должна содержать посторонние вещества и может быть исследована на онкогенные свойства.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Все вещества, используемые для изготовления вакцин, должны быть свободными от контаминации. Следует использовать клетки, пассированные не более 20 раз от исходного клеточного сырья. Посевной вирус должен быть не более чем в пяти пассажах от MSV. Генетически сконструированные штаммы вирусных вакцин обрабатывают так же, как штаммы традиционно аттенуированных вакцин. Когда выращивают достаточное количество клеток, осуществляют заражение клеточной линии вакцинным вирусом. Добавление антибиотиков обычно ограничивается жидкостями клеточной культуры. Надосадочную жидкость собирают в пиковые моменты выработки вируса (антигена). В случае живых вакцин надосадочную жидкость осветляют, смешивают со стабилизатором,

лиофилизуют и разливают во флаконы. Для получения классических инактивированных вакцин надосадочную жидкость гомогенизируют перед добавлением инактивирующего агента для обеспечения надлежащей инактивации. После процедуры инактивации проводят исследование на подтверждение полной инактивации вируса. Исследование должно включать как минимум два пассирования в клетках. Суспензию инактивированного вируса затем смешивают с адьювантом и разливают во флаконы. Производство вакцин должно соответствовать руководящим принципам надлежащей производственной практики (GMP) и местным нормам и стандартам, таким как Европейская фармакопея или Кодекс федеральных норм Соединенных Штатов (9CFR).

2.2.3. Внутрисистемный контроль

Должно быть установлено, что рабочий клеточный посевной материал и рабочие посевные вирусы не контаминированы. Клетки должны проявлять неяркую морфологию перед инокуляцией вирусом. ЦПД проверяют во время культивирования. Неинокулированные контрольные клетки должны сохранять морфологию до момента сбора продуктов реакции. Титрование вируса проводят на собранной надосадочной жидкости. В ходе производства инактивированных вакцин проводят тесты исследования для подтверждения инактивации. Конечный продукт проверяют на отсутствие контаминации.

2.2.4. Исследования партии готовой продукции

Следующие исследования обычно подлежат выполнению в отношении каждой партии. Примеры руководящих принципов для проведения контроля партии можно найти в директивах ЕС, Европейской Фармакопее и 9CFR.

i) Стерильность / чистота

Бактерии, грибы, микоплазма и посторонние вирусы должны отсутствовать. Испытания на стерильность и отсутствие контаминации биологическими материалами, предназначенными для ветеринарного использования, можно найти в главе 1.1.9.

ii) Безопасность

В случае инактивированных вакцин, двукратная доза вакцины и в случае живых вакцин, десятикратная доза вакцины, не должны вызывать побочных действий у БГВ-1 сероотрицательных телят.

iii) Исследование партии на иммуногенность

Достаточно исследовать на иммуногенность одну репрезентативную партию, как описано в разделе С.2.3.2. Для живых вакцин определяют титр вируса каждой партии, который должен составлять не более 1/10 дозы, при которой вакцина считается безопасной, и не ниже минимального титра. В случае инактивированных вакцин исследование на иммуногенность проводят с использованием другого утвержденного метода, например, оценки эффективности у телят.

2.3. Требования к авторизации

2.3.1 Требования к безопасности

i) Безопасность животных-мишеней и животных-не мишеней

Количество вируса, эквивалентное десяти дозам вакцины, не должно (а) вызывать значительных локальных или системных реакций у телят; (б)

быть причиной внутриутробной инфекции или абортаций и (в) восстанавливать вирулентность в течение пяти последовательных пассирований на телятах. В случае инактивированной вакцины обычно вводят двойную дозу. Реверсия вирулентности не применима к инактивированным вакцинам.

ii) Реверсия вирулентности для аттенуированных / живых вакцин

Выбранный конечный штамм вакцины не должен восстанавливать вирулентность в течение не менее пяти последовательных пассирований на телятах.

iii) Экологическое обоснование

Аттенуированные вакцинные штаммы не должны автономно распространяться в популяции КРС ($R_0 < 1$).

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

Приведенные ниже требования должны соблюдаться в экспериментах по контрольному заражению вакциной в лабораторных условиях. Примерные рекомендации приведены в монографии Европейской Фармакопеи (Третье издание (1997 г.)). Вакцину вводят десяти 2-3-месячным БГВ-1 сероотрицательным телятам. Двух телят содержат в качестве контрольных образцов. Через 3 недели всем телятам интраназально вводят вирулентный штамм БГВ-1, что приводит к возникновению типичных клинических признаков заражения БГВ-1. У вакцинированных телят клинические признаки заражения должны отсутствовать или проявляться в слабо выраженной форме. Максимальный (пиковый) титр вируса в слизистой оболочке носовой полости вакцинированных телят должен быть как минимум в 100 раз ниже, чем у контрольных телят. Период выведения вируса должен быть как минимум на 3 дня короче, чем у контрольных телят.

Эффективная вакцина БГВ-1 должна индуцировать защитный иммунитет в течение не менее 1 года, хотя многие существующие вакцины не были исследованы на соответствие требованиям данного стандарта.

ii) Для борьбы и искоренения

В дополнение к вышеупомянутым критериям, в целях борьбы и искоренения болезни, вакцины БГВ-1 должны быть маркерными вакцинами (например, вакцины с делецией gE), что позволит дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных (стратегия DIVA). Некоторые вакцины с делецией gE (инактивированные препараты, а также модифицированные живые вакцины) являются коммерчески доступными.

2.3.3. Стабильность

Что касается живых вакцин, титрования вируса проводят через 3 месяца после указанного срока хранения. Кроме того, проводят исследования для определения содержания влаги, концентраций консервантов и уровня pH. Инактивированные вакцины также исследуют на вязкость и стабильность эмульсии.

Эффективность консервантов должна быть подтверждена

экспериментально. Концентрация консерванта и его устойчивость на протяжении всего срока годности должны быть проверены. Концентрация должна соответствовать пределам, установленным для данного консерванта.

3. Вакцины на основе биотехнологии

3.1. Доступные вакцины и их преимущества

Существуют инактивированные и модифицированные живые вакцины с делетированным гликопротеином Е (gE) на основе рекомбинантных штаммов. Такие вакцины сопоставимы с другими вакцинами с делетированным gE и лицензированы Европейским агентством по лекарственным средствам (ЕМА) для использования на территории ЕС.

Дополнительные рекомбинантные вакцины, такие как gD-субъединицы или генно-инженерные делеционные мутанты БГВ-1 (например, с делецией gE и / или gG), описаны и доступны в качестве прототипов.

Преимущества вакцин БГВ-1, основанных на биотехнологии, могут иметь дополнительные маркерные характеристики для дифференцирования инфицированных и вакцинированных животных (DIVA, например, gB-антитело-ИФА для gD-субъединичных вакцин или gG-антитело-ИФА для соответствующих делеционных мутантов).

3.2. Специальные требования к биотехнологическим вакцинам, если таковые имеются

Рекомбинантные вакцины, предназначенные для использования в ЕС, должны быть лицензированы ЕМА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ABRIL C., ENGELS M., LIMAN A., HILBE M., ALBINI S., FRANCHINI M., SUTER M. & ACKERMANN M. (2004). Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J. Virol.*, **78**, 3644–3653.
- ASHBAUGH S.E., THOMPSON K.E., BELKNAP E.B., SCHULTHEISS P.C., CHOWDHURY S. & COLLINS J.K. (1997). Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 387–394.
- BEER M., KÖNIG P., SCHIELKE G. & TRAPP S. (2003). Markerdiagnostik in der Bekämpfung des Bovinen Herpesvirus vom Typ 1: Möglichkeiten und Grenzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **116**, 183–191.
- BÖTTCHER J., BOJE J., JANOWETZ B., ALEX M., KÖNIG P., HAGG M., GÖTZ F., RENNER K., OTTERBEIN C., MAGES J., MEIER N. & WITTKOWSKI G. (2012). Epidemiologically non-feasible singleton reactors at the final stage of BoHV1 eradication: serological evidence of BoHV2 cross-reactivity. *Vet. Microbiol.*, **159** (3–4), 282–290.
- BITSCH V. (1978). The P37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta Vet. Scand.*, **19**, 497–505.
- BOSCH J.C., DE JONG M.C.M., FRANKEN P., FRANKENA K., HAGE J.J., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., NOORDHUIZEN J.P.T.M., VAN DER POEL W.H.M., VERHOEFF J., WEERDMEESTER K., ZIMMER G.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998). An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine*, **16**, 265–271.
- BRUNNER D., ENGELS M., SCHWYZER M. & WYLER R. (1988). A comparison of three

techniques for detecting bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in naturally and experimentally contaminated bovine semen. *Zuchthygiene (Berlin)*, **23**, 1–9.

DEKA D., MAITI RAMNEEK N.K. & OBEROI M.S. (2005). Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1085–1094.

EDWARDS S., CHASEY D. & WHITE H. (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Res. Vet. Sci.*, **34**, 42–45.

EDWARDS S. & GITAO G.C. (1987). Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ИФА and reverse passive haemagglutination. *Vet. Microbiol.*, **13**, 135–141.

EDWARDS S., WHITE H. & NIXON P. (1990). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 isolated in the U.K. *Vet. Microbiol.*, **22**, 213–223.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 3RD EDITION (1997). Monograph 0696: Live freeze dried vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. Council of Europe, Strasbourg, France.

FRANKENA K., FRANKEN P., VANDEHOEK J., KOSKAMP G. & KRAMPS J.A. (1997). Probability of detecting antibodies to bovine herpesvirus 1 in bulk milk after the introduction of a positive animal on to a negative farm. *Vet. Rec.*, **140**, 90–92.

FUCHS M., HUBERT P., DETTERER J. & RZIHA H.-J. (1999). Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2498–2507.

GROM J., HOSTNIK P., TOPLAK I. & BARLIC-MAGANJA D. (2006). Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. *Vet. J.*, **171**, 539–544.

KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., RIJSEWIJK F.A.M., QUAK J., GIELKENS A.L.J. & VAN OIRSCHOT J.T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, **12**, 439–444.

KEUSER V., SCHYNTS F., DETRY B., COLLARD A., ROBERT B., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.-P. & THIRY E. (2004). Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovineherpesvirus 1. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1228–1235.

KRAMPS J.A., BANKS M., BEER M., KERKHOF P., PERRIN M., WELLENBERG G.J. & VAN OIRSCHOT J.T. (2004). Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet Microbiol.*, **102**, 169–181.

KRAMPS J.A., QUAK S., WEERDMEESTER K & VAN OIRSCHOT J.T. (1993). Comparative study on sixteen enzyme- linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet. Microbiol.*, **35**, 11–21.

LEMAIRE M., WEYNANTS V., GODFROID J., SCHYNTS F., MEYER G., LETESSON J.J. & THIRY E. (2000). Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1885–1894.

LOVATO L., INMAN M., HENDERSON G., DOSTER A. & JONES C. (2003). Infection of cattle with a bovine Herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latencyrelated gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J. Virol.*, **77**, 4848–4857.

MAGYAR G., TANYI J., HORNYAK A. & BATHA A. (1993). Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis. *Acta Vet. Hung.*, **41**, 159–170.

- MARS M.H., DE JONG M.C.M., FRANKEN P. & VAN OIRSCHOT J.T. (2001). Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*, **19**, 1924–1930.
- MASRI S.A., OLSON W., NGUYEN P.T., PRINS S. & DEREGT D. (1996). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Can. J. Vet. Res.*, **60**, 100–107.
- MECHOR G.D., ROUSSEAU C.G., RADOSTITS O.M., BABIUK L.A. & PETRIE L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can. J. Vet. Res.*, **51**, 452–459.
- METZLER A.E., MATILE H., GASSMANN U., ENGELS M. & WYLER R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, **85**, 57–69.
- MOORE S., GUNN M. & WALLS D. (2000). A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet. Microbiol.*, **75**, 145–153.
- NYLIN B., STROGER U. & RONSHOLT L. (2000). A retrospective evaluation of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ИΦA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, **47**, 91–105.
- PARSONSON I.M. & SNOWDON W.A. (1975). The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust. Vet. J.*, **51**, 365–369.
- PERRIN B., BITSCH V., CORDIOLI P., EDWARDS S., ELOIT M., GUERIN B., LENIHAN P., PERRIN M., RONSHOLT L., VAN OIRSCHOT J.T., VANOPDENBOSCH E., WELLEMANS G., WIZIGMANN G. & THIBIER M. (1993). A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 969–984.
- PERRIN B., CALVO T., CORDIOLI P., COUDERT M., EDWARDS S., ELOIT M., GUERIN B., KRAMPS J.A., LENIHAN P., PASCHALERI E., PERRIN M., SCHON J., VAN OIRSCHOT J.T., VANOPDENBOSCH E., WELLEMANS G., WIZIGMANN G. & THIBIER M. (1994). Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **13**, 947–960.
- RIJSEWIJK F.A., KAASHOEK M.J., LANGEVELD J.P., MELOEN R., JUDEK J., BIENKOWSKA-SZEWCZYK K., MARIS-VELDHUIS M.A. & VAN OIRSCHOT J.T. (1999). Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1477–1483.
- ROLA J., POLAK M. & ZMUDZINSKI J. (2003). Amplification of DNA of BHV 1 isolated from semen of naturally infected bulls. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, **47**, 71–75.
- ROS C., RIQUELME M.E., OHMAN FORSLUND K. & BELAK S. (1999). Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genome sequences. *J. Virol. Methods*, **83**, 55–65.
- SANTURDE G., SILVA N.D., VILLARES R., TABARES E., SOLANA A., BAUTISTA J.M., CASTRO J.M. & DA SILVA N. (1996). Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.*, **49**, 81–92.
- SCHROEDER C., HORNER S., BÜRGER N., ENGEMANN C., BANGE U., KNOOP E.V. & GABERT J. (2012). Improving the sensitivity of the IBR-gE ИΦA for testing IBR marker vaccinated cows from bulk milk. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **125**, 290–296.
- SCHYNTS F., BARANOWSKI E., LEMAIRE M. & THIRY E. (1999). A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet.*

Microbiol., **66**, 187–195.

SMITS C.B., VAN MAANEN C., GLAS R.D, DE GEE A.L., DIJKSTRAB T, VAN OIRSCHOT J.T. & RIJSEWIJK F.A. (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virol. Methods*, **85**, 65–73.

TERPSTRA C. (1979). Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by direct immunofluorescence. *Vet. Q.*, **1**, 138–144.

THIRY J., KEUSER V., MUYLKENS B., MEURENS F., GOGEV S., VANDERPLASSCHEN A. & THIRY E. (2006). Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.*, **37**, 169–190.

VAN ENGELENBURG F.A., MAES R.K., VAN OIRSCHOT J.T. & RIJSEWIJK F.A. (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 3129–3135.

VAN ENGELENBURG F.A.C., VAN SCHIE F.W., RIJSEWIJK F.A.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1995). Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 308–312.

VAN OIRSCHOT J.T., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., WEERDMEESTER K. & RIJSEWIJK F.A.M. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J. Virol. Methods*, **67**, 23–34.

VAN OIRSCHOT J.T., STRAVER P.J., VAN LIESHOUT J.A.H., QUAK J., WESTENBRINK F. & VAN EXSEL A.C.A. (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.*, **132**, 32–35.

VILCEK S., NETTLETON P.F., HERRING J.A. & HERRING A.J. (1994). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **42**, 53–64.

WANG J., O'KEEFE J., ORR D., LOTH L., BANKS M., WAKELEY P., WEST D., CARD R., IBATA G., VAN MAANEN K., THOREN

P., ISAKSSON M. & KERKHOFS P. (2008). An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Vet. Microbiol.*, **126**, 11–19.

WEIBLEN R., KREUTZ L., CANABOROO T.F., SCHUCH L.C. & REBELATTO M.C. (1992). Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J. Vet. Diag. Invest.*, **4**, 341–343.

WELLENBERG G.J., VERSTRATEN E.R.A.M., MARS M.H. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998a). Detection of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E antibodies in individual milk samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 409–413.

WELLENBERG G.J., VERSTRATEN E.R.A.M., MARS M.H. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998B). ELISA detection of antibodies to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 in bulk milk samples. *Vet Rec.*, **142**, 219–220.

WERNIKE K., HOFFMANN B., KALTHOFF D., KO NIG P. & BEER M. (2011). Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. *J. Virol. Methods*, **174** (1–2), 77–84.

WIEDMANN M., BRANDON R., WAGNER P., DUBOVI E.J. & BATT C.A. (1993). Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods*, **44**, 129–140.

WYLER R., ENGELS M. & SCHWYZER M. (1989). Infectious bovine rhinotracheitis / vulvovaginitis (BHV1). In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Wittmann G., ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 1–72.

XIA J.Q., YASON C.V. & KIBENGE F.S. (1995). Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res.*, **59**, 102–109.

YASON C.V., HARRIS L.M., MCKENNA P.K., WADOWSKA, D. & KIBENAGE F.S.B. (1995). Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. *Can. J. Vet. Res.*, **59**, 94–101.

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по инфекционному ринотрахеиту КРС / инфекционному пустулезному вульвовагиниту (см. Таблицу в Части 4 настоящего Наземного Руководства или см. веб-сайт МЭБ для получения наиболее недавнего списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> <http://www.oie.int/>).

Пожалуйста, свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ для получения дополнительной информации о диагностических тестах, реактивах и вакцинах против инфекционного ринотрахеита КРС / инфекционного пустулезного вульвовагинита

NB: Впервые принят в 1990 году как инфекционный ринотрахеит. Последние обновления приняты в 2017 году