

**РИНОПНЕВМОНИЯ ЛОШАДЕЙ (ИНФЕКЦИЯ ЛОШАДИНЫМ
ГЕРПЕСВИРУСОМ-1 И -4)**

РЕЗЮМЕ

Ринопневмония лошадей (РПЛ) - это собирательный термин для целой группы контагиозных болезней лошадиных, причиной которых является инфекция, вызванная любым из двух близкородственных вирусов герпеса, герпесвирус лошадиных-1 и герпесвирус лошадиных-4 (ГВЛ-1 и ГВЛ-4). Инфекция ГВЛ-1 перечислена в списке МЭБ. ГВЛ-1 и ГВЛ-4 эндемичны в большинстве местных популяций лошадей во всем мире.

Первичная инфекция ГВЛ-1 или ГВЛ-4 характеризуется заболеванием верхних дыхательных путей различной тяжести, что связано с возрастом и иммунным статусом инфицированного животного. ГВЛ-1 также вызывает более серьезные осложнения в виде аборта, перинатальной смерти жеребенка или паралитического неврологического заболевания (герпесвирусная лошадиная миелоэнцефалопатия). ГВЛ-4 проявляет ассоциацию со спорадическими случаями абортов, но не дает больших вспышек, связанных с ГВЛ-1. Как и другие герпесвирусы, ГВЛ-1 и ГВЛ-4 индуцируют длительные латентные инфекции, которые могут обостряться в результате стресса или беременности. Большинство лошадей на протяжении жизни, вероятно, многократно реинфицируются, часто в легкой или субклинической форме. Поэтому выявление вирусной ДНК или антител против ГВЛ следует интерпретировать с осторожностью.

Идентификация возбудителя: *Стандартным методом идентификации ГВЛ-1 и ГВЛ-4 в соответствующем клиническом или некропсийном материале является полимеразная цепная реакция (ПЦР), с последующим лабораторным выделением вируса в клеточной культуре. Положительную идентификацию вирусных изолятов ГВЛ-1 и ГВЛ-4 можно получить посредством типоспецифической ПЦР. Вирусы можно выделить в лошадиной клеточной культуре из назального или назофарингеального материала, взятого от лошадей тампоном во время фебрильной стадии респираторной инфекции, из плаценты, печени, легких, селезенки или тимуса абортированных плодов и рано умерших жеребят, а также из лейкоцитарной фракции крови животных с острой инфекцией ГВЛ-1. ГВЛ-1, в отличие от ГВЛ-4, также способен расти в различных типах клеток нелошадиного происхождения, например, в клеточной линии RK-13, и эту особенность можно использовать, чтобы различить два вида вируса.*

Быстрый предположительный диагноз аборта, вызванного ГВЛ-1 или, в редких случаях, ГВЛ-4, можно поставить в результате прямого иммунофлуоресцентного выявления вирусного антигена в криостатных срезах плаценты и тканях абортированного плода, используя конъюгированную поликлональную антисыворотку.

Посмертная демонстрация гистопатологических повреждений, вызванных ГВЛ-1 в плаценте и тканях абортированных плодов, в случаях перинатальной смерти жеребят или в центральной нервной системе животных с неврологическими нарушениями дополняет лабораторный диагноз.

Серологические тесты: *Большинство лошадей обладает некоторым уровнем антител против ГВЛ-1/4, поэтому выявление специфического антитела в сыворотке, полученной из единичного образца крови, не является подтверждением положительного диагноза недавней инфекции. Парные сыворотки от животных с подозрением на инфекцию ГВЛ-1 или ГВЛ-4, взятые в острой стадии заболевания и в стадии выздоровления, должны быть проверены на четырехкратное или более повышение титра вирус-специфического антитела с реакции нейтрализации вируса (РНВ) или реакции связывания комплемента*

(РСК). Ни один из этих анализов не является типоспецифическим, но оба оказались полезными в диагностическом отношении, особенно потому, что в РСК ответ антитела на недавнюю инфекцию относительно недолог. Типоспецифический твердофазный иммуоферментный анализ также имеет ограниченное применение (Crabb *et al.*, 1995; Hartley *et al.*, 2005).

Потребность в вакцинах: Для помощи в борьбе с ГВЛ-1/4 доступны как живые аттенуированные, так и инактивированные вирусные. Вакцинация полезна для уменьшения тяжести респираторной инфекции у молодых лошадей и частоты абортот у беременных кобыл, однако современные вакцины не лицензированы для защиты от неврологических проявлений болезни. Вакцинацию нельзя считать заменой практике рационального регулирования, которая, заведомо, снижает риск инфекции. Для каждого из известных вакцинных продуктов рекомендуется ревакцинация с короткими интервалами, поскольку продолжительность иммунитета, индуцированного вакциной, относительно невелика.

В странах изготовления и использования вакцин соответствующими ветеринарными контрольно-распорядительными органами установлены стандарты для производства и лицензирования как аттенуированных, так и инактивированных вакцин ГВЛ-1/4. Единый набор признанных на международном уровне стандартов для вакцин ГВЛ недоступен. Однако в каждом случае производство вакцины основано на системе подробного изложения производственного процесса, где используется хорошо охарактеризованная клеточная линия и маточная посевная серия вакцинного вируса, который был аттестован по идентичности, безопасности, вирусологической чистоте, иммуногенности и отсутствию посторонних микробных агентов.

А. ВВЕДЕНИЕ

Ринопневмония лошадей (РПЛ) - это исторический термин, описывающий группу из нескольких нозологических форм болезней лошадей, которые могут включать респираторное заболевание, аборты, неонатальную пневмонию жеребят или миелэнцефалопатию (Allen & Bryans, 1986; Allen *et al.*, 1999; Bryans & Allen, 1988; Crabb & Studdert, 1995). Это заболевание, возбудителем которого является любой из двух членов семейства *Herpesviridae*, герпесвирус лошадиных 1 и 4 (ГВЛ-1 и ГВЛ-4), более 60 лет назад было признано угрозой международной лошадиной индустрии. ГВЛ-1 и ГВЛ-4 - это близкородственные альфа-герпесвирусы лошадей с нуклеотидными последовательностями индивидуальных гомологичных генов, идентичными на 55-84% и аминокислотными последовательностями, идентичными на 55-96% (Telford *et al.*, 1992; 1998). Эти два герпесвируса энзоотичны во всех странах, где большие популяции лошадей сохраняются как часть культурных традиций или экономики сельского хозяйства. Не найдено никаких доказательств того, что эти два герпесвируса РПЛ представляют какую-либо угрозу здоровью людей, имеющих с ними профессиональный контакт. Инфекция ГВЛ-1 перечислена в списке болезней МЭБ.

Вирусная трансмиссия в когортах животных происходит при вдыхании аэрозолей респираторных выделений, который в большом количестве содержат вирус. Проявляется тенденция к максимально высокой заболеваемости у молодых лошадей, дыхание которых происходит в общем воздушном пространстве. Абортированные ткани и плацентарные жидкости от инфицированных кобылиц могут содержать чрезвычайно высокий уровень живого вируса, представляя собой основной источник инфекции. Широкое применение вакцин не позволило избавиться от инфекций ГВЛ, и ежегодные финансовые потери во всемирном масштабе, связанные с этими вирусными патогенами лошадей, огромны.

У лошадей в возрасте менее 3 лет клинические проявления РПЛ обычно принимают форму острой, респираторной болезни с высокой температурой, которая быстро распространяется в группе животных. Вирусы инфицируют эпителиальные клетки слизистой оболочки дыхательных путей, где они и размножаются. Инфекция становится заметной через 2-8 дней после контакта с вирусом, а ее симптомами являются лихорадка, отсутствие аппетита, депрессия и назальные выделения. Тяжесть респираторного заболевания изменчива в зависимости от возраста лошади и уровня иммунитета в связи с предыдущей вакцинацией или естественным воздействием вируса. Высокая температура и осложнения более вероятны при инфекции ГВЛ-1 по сравнению с ГВЛ-4. Субклинические проявления инфекции ГВЛ-1/4 довольно распространены, даже у молодых животных. Хотя смертность от неосложненной РПЛ совсем невелика, и нормальный исход болезни - это полное выздоровление через 1-2 недели, частой и значительной причиной срыва графиков тренировок, скачек или других видов соревнований на лошадях является респираторная инфекция. Полная иммунная защита после перенесенной инфекции кратковременна, и выздоровевшие животные восприимчивы к повторной инфекции ГВЛ-1/4 уже через несколько месяцев. Хотя реинфекции этими двумя герпесвирусами вызывают менее тяжелое или клинически бессимптомное респираторное заболевание, повторный риск аборта или неврологических проявлений болезни сохраняется. Подобно другим герпесвирусам, ГВЛ-1/4 вызывают длительные латентные инфекции, и лошади с латентной формой представляют потенциальный риск инфекции для других животных. Повторная активация вирусной инфекции возможна в результате стресса или при наступлении беременности. Самые большие клинические угрозы действиям по размножению лошадей, скачкам или прогулкам на лошадях удовольствия, связанные с РПЛ, заключаются в возможных абортных и неврологических последствиях респираторной инфекции ГВЛ-1.

Неврологическое заболевание, также известное как лошадиная герпесвирусная миелэнцефалопатия, остается нечастым, но тяжелым осложнением инфекции ГВЛ-1. Ассоциацию с повышенным риском неврологической формы болезни проявляет единичная мутация в гене ДНК-полимеразы (ORF30), однако штаммы без этой мутации также могут вызвать паралич (Nugent *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2007). Для идентификации вирусов, несущих невропатический маркер, были использованы методики молекулярно-генетического типирования штаммов, и знание о повышенном риске неврологических осложнений может быть полезно. Однако с практической точки зрения типирование штаммов не имеет значения для идентификации возбудителя или для международной торговли. Типирование штаммов может быть полезным внедрением в меры биобезопасности по борьбе со вспышками герпесвирусной миелэнцефалопатии у лошадей.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

Как ГВЛ-1, так и ГВЛ-4 обладают потенциалом высокой контагиозности вирусами, причем первый из них может вызывать взрывные вспышки абортов или неврологической формы болезни. Поэтому для борьбы с инфекцией полезны быстрые диагностические методы. Диагностическими лабораториями широко используются анализы по методу полимеразной цепной реакции (ПЦР), для которых характерны как быстрота, так и чувствительность. Были разработаны анализы по методике ПЦР в режиме реального времени, которые позволяют одновременно проводить тестирование на ГВЛ-1 и ГВЛ-4 и определять количественную вирусную нагрузку. Также может быть полезным выделение

вируса, особенно для обнаружения виремии. Это также применимо к абортам и неонатальной смертности жеребят, связанным с ГВЛ-1, когда высокий уровень вируса в тканях обычно дает цитопатический эффект в течение 1-3 дней. Для быстрой диагностики в свежем или залитом парафином тканевом материале аборт, индуцированных ГВЛ, могут быть чрезвычайно полезными иммуногистохимические или иммунофлуоресцентные подходы, которые носят относительно прямой характер. Также были описаны несколько других методик на основе твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) или зондов для гибридизации нуклеиновых кислот, однако их использование часто ограничивается узким кругом специализированных лабораторий, поэтому они не включены в данный обзор.

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики ринопневмонии лошадей и их целевое назначение

| Метод | Целевое назначение | | | | | Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации |
|--|---------------------------------|--|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| | Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельных животных | Вклад в политику искоренения | Подтверждение клинических случаев | Надзор за распространением инфекции | |
| Идентификация возбудителя¹ | | | | | | |
| Выделение вируса | – | +++ | – | +++ | – | – |
| ПЦР | – | +++ | – | +++ | – | – |
| Выявление иммунной реакции | | | | | | |
| РНВ | + | + | + | +++ | +++ | +++ |
| ИФА | + | + | + | ++ | +++ | + |
| РСК | – | – | – | +++ | – | – |

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами; – = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РНВ = реакция нейтрализации вируса; твердофазный ИФА = твердофазный иммуоферментный анализ. РСК = реакция связывания комплемента.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Сбор и приготовление образцов

Мазки из носа/носоглотки: вытяжку из мазка, взятого тампоном, можно использовать для выделения ДНК и последующего выявления вируса посредством ПЦР с применением одной из множества известных методик или наборов, имеющих в продаже (см. ниже). Материал мазка, взятого тампоном, также можно попытаться использовать для выделения вируса. Для того чтобы повысить вероятность выделения живого вируса, мазки лучше всего брать у лошадей на самых ранних фебрильных стадиях респираторного заболевания и через ноздри обрабатывая нужную область слизистой тампоном подходящего размера и длины для лошадей. После взятия мазка тампон надо извлечь и немедленно отправить в вирусологическую лабораторию в 3 мл холодной (не

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

замороженной) транспортной среды для вирусов (например, ЗФФР [забуференный фосфатом физиологический раствор] или бессывороточная МПС [минимальная поддерживающая среда] с антибиотиками). Инфективность вируса можно пролонгировать при добавлении бычьего сывороточного альбумина, эмбриональной телячьей сыворотки или желатина до 0,1% (в отношении веса к объему).

Тканевые образцы: тотальную ДНК можно выделить при помощи многих наборов, имеющихся в продаже, и использовать в ПЦР для выявления вирусной ДНК (описано ниже в разделе В.1.2.1). Выделение вируса из плаценты и эмбриональных тканей в случаях аборта, подозрительного на инфекцию ГВЛ-1, бывает наиболее успешным при выполнении на асептически полученных образцах плаценты, печени, легких, тимуса и селезенки. В случаях неврологической инфекции ГВЛ-1 вирус можно выделить посмертно из культуры образцов головного и спинного мозга. Такие попытки выделения вируса часто бывают неудачными, однако, они могут быть полезны для тестирования методом ПЦР и патологического исследования. Тканевые образцы следует отправлять в лабораторию и сохранять при температуре 4°C до прививки в тканевую культуру. Образцы, которые невозможно обработать в течение нескольких часов, надо хранить при температуре -70°C.

Кровь: для выделения вируса из лейкоцитов надо взять образец крови объемом 20 мл, используя асептическую методику, в цитрате, гепарине или ЭДТУ (этилендиаминтетрауксусной кислоте), используемых в качестве антикоагулянта. Предпочтительным антикоагулянтом для ПЦР является ЭДТУ. Образцы следует без задержки отправлять в лабораторию на льду, но, не замораживая их.

1.2. Выявление вируса посредством полимеразной цепной реакции

ПЦР стала основным методом диагностики для выявления ГВЛ-1 и ГВЛ-4 в клинических образцах, в залитых парафином архивных тканевых образцах или в привитых клеточных культурах (Borchers & Slater, 1993; Lawrence *et al.*, 1994; O'Keefe *et al.*, 1994; Varrasso *et al.*, 2001). Было разработано множество типоспецифических праймеров ПЦР для того, чтобы можно было различить присутствие ГВЛ-1 и ГВЛ-4. Корреляция между ПЦР и методиками выделения вируса для диагностики ГВЛ-1 или ГВЛ-4 довольно высока (Varrasso *et al.*, 2001). Диагностика посредством ПЦР отличается быстротой и чувствительностью, а также не зависит от присутствия инфекционного вируса в клиническом образце.

Методы ПЦР наиболее надежны для диагностики активной инфекции ГВЛ при анализе тканевых образцов ткани от абортированных плодов и плацентарной ткани или материала носоглоточных мазков от жеребят и лошадей-однолеток. Они особенно полезны при взрывных вспышках абортов, респираторного или неврологического заболевания, поскольку в этих ситуациях быстрая идентификация вируса очень важна для управленческой стратегии, включая миграционные ограничения. При поиске диагноза для лошадей с признаками неврологической патологии важно исследование ткани головного и спинного мозга, а также мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) по методу ПЦР.

Было опубликовано несколько аналитических методик ПЦР. Процедуру гнездовой ПЦР можно использовать для различения между ГВЛ-1 и ГВЛ-4. Точный протокол анализа, подходящий для клинических или патологических образцов (назальные выделения, лейкоциты крови, головной и спинной мозг, эмбриональные ткани и т.д.), был описан в работе Borchers & Slater (1993). Однако для методов гнездовой ПЦР характерен высокий риск перекрестной контаминации в лаборатории, поэтому для обнаружения ГВЛ-1 и

ГВЛ-4 предпочтительны чувствительные и быстрые одноэтапные методики ПЦР (например, Lawrence *et al.*, 1994). Для различения между ГВЛ-1 и ГВЛ-4 Справочные лаборатории МЭБ используют количественные анализы ПЦР в режиме реального времени, нацеленные на гетерологичные последовательности главных генов гликопротеина. Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени, нацеленная на ген гликопротеина В ГВЛ-1 и ГВЛ-4, была описана Diallo *et al.* (2007). Были разработаны протоколы ПЦР, позволяющей провести дифференциальный диагноз между штаммами ГВЛ-1, несущими нейропатогенный маркер ORF30, в которой используются оба продукта расщепления ПЦР рестрикционным ферментом (Fritsche & Borchers, 2011) или количественной ПЦР в режиме реального времени (Аллен *et al.*, 2007, Смит *et al.*, 2012). Также были разработаны методы типирования штаммов в эпидемиологических целях, основанные на анализе гена ORF68 (Nugent *et al.*, 2006). Справочные лаборатории МЭБ используют для типирования штаммов собственные методики, однако эти протоколы еще не были утверждены для использования в разных лабораториях на международном уровне.

ПЦР в режиме реального времени (или количественная ПЦР) стала методом выбора для многих диагностических тестов, поскольку она обеспечивает быстрое и чувствительное выявление вирусной ДНК. Были описаны анализы методом ПЦР в режиме реального времени для ГВЛ-1 и ГВЛ-4. Тест ПЦР в режиме реального времени, кратко описанный ниже, был утвержден по стандарту ISO 17025 в британской Справочной лаборатории МЭБ. Это тест предназначен для использования в 96-луночном формате. Эту методику легко можно сочетать с автоматическими методами выделения нуклеиновых кислот. Данный мультиплексный анализ включает амплификацию последовательностей вирусной ДНК, специфичных для ГВЛ-1 или для ГВЛ-4, в тканевых образцах от лошадей, в назальных мазках или в смывах из дыхательных путей. Он не был утвержден для использования с такими материалами как цельная кровь или лейкоцитарная пленка. Целевой регион для амплификации каждого вируса находится в консервативной типоспецифической области типа гена гликопротеина В (гВ) для ГВЛ-1 и ORF17 (кодирующего UL43) для ГВЛ-4. Разделение между ГВЛ-1 и ГВЛ-4 выполняется посредством встраивания типоспецифических зондов с двойной меткой. Метод использует праймеры собственной разработки и зонды, основанные на методах, опубликованных в работах Hussey *et al.* (2006) и Lawrence *et al.* (1994). Для введения в практику такого диагностического анализа ПЦР в режиме реального времени необходима проверка метода на контрольных образцах по принципу слепого исследования. Чувствительность и специфичность анализа надо определять применительно к каждой цели. Поддержку в разработке анализов и соответствующих панелей образцов можно получить из Справочных лабораторий МЭБ.

Можно также использовать утвержденные альтернативные протоколы с соответствующей оптимизацией времени и температуры в рабочих циклах амплификатора, например, методы Diallo *et al.* (2006; 2007), Allen (2007).

1.2.1. Протокол теста

і) Подходящие образцы

Можно использовать посмертные ткани от новорожденных и взрослых лошадей или тканевой материал абортусов (содержащий ткани легких, печени, селезенки, тимуса, надпочечников и плаценты). В качестве респираторных образцов применимы носоглоточные или глубокие назальные тампонные мазки (пересылаемые в подходящей среде для транспортировки вирусного материала), трахеальные смывы (ТС) или бронхоальвеолярные смывы (БАС). Выделение ДНК следует проводить, применяя соответствующий набор реактивов или роботизированную систему.

ii) Праймеры и зонды

ГВЛ 1 прямой: GGG-GTT -CTT-AAT-TGC-ATT-CAG-ACC

ГВЛ 1 обратный: GTA-GGT -GCG-GTT-AGA-TCT-CAC-AAG

ГВЛ 4 прямой: TAG-CAA-ACA-CCC-ACT-AAT-AAT-AGC-AAG

ГВЛ 4 обратный: GCT-CAA-ATC-TCT-TTA-TTT-TAT-GTC-ATA-TGC

зонд для гВ ГВЛ 1: {FAM}TCT-CCA-ACG-AAC-TCG-CCA-GGC-TGT-ACC{BHQ1}

зонд для ORF17 ГВЛ 4: {JOE}CGG-AAC-AGG-AAC-TCA-CTT-CAG-AGC-CAG-C{BHQ1}

iii) Стандарты ПЦР в режиме реального времени

Для количественного определения уровня вирусной ДНК необходимо использовать стандартную кривую ДНК, включая, по меньшей мере, четыре стандарта, содержащие целевую ДНК ГВЛ-1 и ГВЛ-4 в известных концентрациях. Для стабилизации ДНК в растворе все стандарты должны быть разведены в 1 нг/мл полиинозиновой-полицитидиловой кислоты (поли И/Ц). Их надо хранить при температуре -20°C и не подвергать многократному замораживанию-оттаиванию. По запросу из Справочной лаборатории МЭБ в Великобритании доступны подходящие плазмиды.

iv) Процедура тестирования

Из-за чрезвычайной чувствительности тестов на основе ПЦР крайне важно устранить все возможные источники загрязнения материала нуклеиновыми кислотами. Все оборудование и реактивы должны иметь сортовую принадлежность к исследованиям по молекулярной биологии/ПЦР и быть заведомо свободными от загрязняющих нуклеиновых кислот, нуклеаз или других ферментов, создающих помехи.

Реакции должны быть подготовлены с соответствующими наборами типа мастер-микс для ПЦР. Реакции и сбор данных выполняют в амплификаторе реального времени, использующем оптимизированные условия для данной машины. Количество вирусной ДНК в каждом образце можно определить по сравнению с известными стандартами ДНК, однако в каждый запуск реакции также необходимо включать подходящие положительные и отрицательные контрольные пробы: вода как безматричный контроль, буфер, подвергнутый обработке методом извлечения образца (отрицательный контроль) и вирусный материал ГВЛ-1 и ГВЛ-4 (положительный контроль). Для того чтобы обеспечить постоянное качество анализа, для каждого запуска ПЦР надо зарегистрировать и регулярно контролировать значения порогового цикла (Пц), исходя из известного стандарта с малым количеством копий (например, 100).

1.3. Выделение вируса

Для эффективного первичного выделения ГВЛ-4 из материала, полученного от лошадей с респираторным заболеванием, необходимо использовать клеточные культуры лошадиного происхождения. Как ГВЛ-1, так и ГВЛ-4 можно выделить из материала носоглоточных мазков, используя первичные эмбриональные клетки почек или лошадиные фибробласты, полученные из кожи (E-Derm) или легочной ткани. ГВЛ-1 также можно выделять на других типах клетки, как это будет обсуждено позже. Материал назофарингеального мазка и сопровождающую транспортную среду переносят в цилиндр стерильного шприца объемом 10 мл. Используя стерильный поршень, жидкость с мазка выдавливают в стерильную пробирку. Если ожидается тяжелое бактериальное загрязнение, то часть выдавленной жидкости можно пропустить через стерильный шприцевой фильтр с мембраной калибра 0,45 мкм во вторую стерильную пробирку, но эта манипуляция также может понизить титр вируса. Недавно приготовленные монослои клеток во флаконах с тканевой культурой инокулируют

фильтрованным, а также нефилтрованным экстрактом из назофарингеального мазка. Также можно использовать монослои клеток в многолуночных планшетах, инкубированных в окружающей среде с 5% CO₂. Вирусу позволяют прикрепиться к клеткам, инкубируя привитые монослои при температуре 37°C. Параллельно инкубируют монослои непривитых контрольных клеток.

В конце периода прикрепления вируса прививочный материал удаляют, и монослои дважды промывают физиологическим раствором, забуференным фосфатом (ЗФФР), чтобы удалить антитела, нейтрализующие вирус, которые могут присутствовать в назофарингеальных выделениях. После добавления обогащенной поддерживающей среды (МПС с 2% эмбриональной телячьей сыворотки [ЭТС] и двойной стандартной концентрацией антибиотиков/фунгицидов [пенициллин, стрептомицин, гентамицин и амфотерицин В]), флаконы инкубируют при 37°C. Использование положительных контрольных вирусных образцов для проверки надежности процедуры выделения сопряжено с риском случайного загрязнения диагностических образцов. Этот риск можно свести к минимуму при помощи обычных мер предосторожности и хорошей лабораторной методики, включающей использование боксов биологической безопасности, прививку положительных контрольных образцов после диагностических, дезинфекцию поверхностей в вытяжном шкафу при адсорбировании прививочного материала и использование положительного контроля с относительно низким вирусным титром. Инокулированные флаконы надо ежедневно проверять микроскопически на появление характерного герпесвирусного цитопатического эффекта (ЦПЭ) (фокальное округление, увеличение преломляемости и отделение клеток). Культуры, не проявляющие доказательств вирусного ЦПЭ через 1 неделю инкубации, должны быть перевиты по слепому принципу в свежеприготовленные монослои клеток, используя в качестве прививочного материала маленькие аликвоты определенные как среды, так и клеток. Дальнейший слепой пассаж обычно непродуктивен.

Тканевые образцы: Для выделения ГВЛ-1 можно использовать многие типы клеток (например, почечные клетки кролика [RK-13 (AATC-CCL37)], детские почечные клетки хомяка [BhK-21], бычьи почечные клетки Мадин-Дарби [MDBK], почечные клетки свиньи [PK-15], и т.д.). Может оказаться полезной параллельная прививка образцов как в лошадиные, так и в другие клетки для различения между ГВЛ-1 и ГВЛ-4, поскольку ГВЛ-4 может вызывать аборт лишь в спорадических случаях. Для выделения вируса используют приблизительно 10% (в отношении веса к объему) тканевых гомогенатов печени, легких, тимуса и селезенки (от абортированных плодов) или ткани центральной нервной системы (при неврологической форме болезни). Образцы материала готовят, измельчая небольшие фрагменты тканей анатомическими ножницами на кусочки размером около 1 мм в стерильной чашке Петри с их последующей мацерацией в бессывороточной культуральной среде с антибиотиками при помощи гомогенизатора или механической дробилки для тканей. После центрифугирования с ускорением 1200 g в течение 10 минут надосадочную жидкость сливают и 0,5 мл инокулируют в двойные монослои клеток во флаконах с тканевой культурой. После инкубации привитых клеток при 37°C в течение 1,5-2 часов прививочный материал удаляют, а монослои клеток дважды промывают ЗФФР или поддерживающей средой. После добавления 5 мл обогащенной поддерживающей среды флаконы инкубируют при 37°C не более 1 недели (до того момента, когда появится наблюдаемый вирусный ЦПЭ). Культуры, не проявляющие доказательств вирусного ЦПЭ через 1 неделю инкубации, должны быть перевиты во второй раз в свежеприготовленные монослои клеток, используя в качестве прививочного материала маленькие аликвоты определенные как среды, так и клеток.

Образцы крови: ГВЛ-1 и, в редких случаях, ГВЛ-4 можно выделить из МКПК. Лейкоцитарные пленки можно получить из несвернувшейся крови центрифугированием при ускорении 600 g в течение 15 минут, снимая лейкоцитарную пленку после тщательного удаления плазмы. После этого лейкоцитарную пленку наслаивают на сепарирующий раствор для МКПК (Фиколл с плотностью 1077 г/мл, имеется в продаже) и центрифугируют с ускорением 400 g в течение 20 минут. Поверхность раздела МКПК (без большей части гранулоцитов) дважды отмывают в ЗФФР (300 г в течение 10 минут) и ресуспендируют в 1 мл МПС, содержащей 2% ЭТС. В качестве более быстрого альтернативного метода МКПК можно собрать из плазмы непосредственным центрифугированием. Аликвоту суспензии отмываемых клеток добавляют к каждому из двойных монослоев лошадиных фибробластов, монослоев эмбриональных лошадиных клеток или клеток РК-13 в культуральных матрасах площадью 25 см², содержащих 8-10 мл свежедобавленной поддерживающей среды. Культуральные матрасы инкубируют при 37°C в течение 7 дней, либо удаляя, либо не удаляя прививочный материал. Если МКПК не удаляют до инкубации, обнаружение ЦПЭ может оказаться трудным в присутствии массивного инокулята лейкоцитов: Каждый культуральный матрас с клетками замораживают и оттаивают после 7-дневной инкубации, и содержимое центрифугируют с ускорением 300 g в течение 10 минут. Наконец, 0,5 мл бесклеточной надосадочной жидкости из культуральной среды переносят в свежееизготовленные монослои клеток, которые только что стали субконфлюэнтными. Их инкубируют и наблюдают на вирусный ЦПЭ, по меньшей мере, в течение 56 дней. И вновь, образцы, не демонстрирующие признаков вирусного ЦПЭ, через 1 неделю инкубации следует перевить во второй раз прежде, чем провести их выбраковку в качестве отрицательных.

Идентичность вируса можно подтвердить посредством ПЦР или иммунофлюоресценции со специфическими антисыворотками. Вирусные изоляты из положительных культур следует направить в Справочную лабораторию МЭБ для поддержания архива разных географических источников вирусного материала. Некоторыми лабораториями может быть предоставлена дальнейшая характеристика штамма в целях наблюдения или выявления неврологического маркера.

1.4. Выявление вируса посредством прямой иммунофлюоресценции

Выявление антигенов ГВЛ посредством прямой иммунофлюоресценции в образцах тканей, собранных из абортированного материала и плацентарной ткани, позволяет получить быстрый предварительный диагноз герпесвирусного аборта. (Gunn, 1992). Диагностическая надежность этой методики примерно соответствует попыткам выделения вируса из тех же тканей.

В США мощная поликлональная антисыворотка к ГВЛ-1, приготовленная на свиньях и конъюгированная с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), доступна с этой целью ветеринарным диагностическим лабораториям по запросу из государственной лаборатории ветеринарной службы министерства сельского хозяйства США (USDA). Эта антисыворотка дает перекрестную реакцию с ГВЛ-4 и, следовательно, неприменима для серотипирования, однако на любых образцах, дающих положительную реакцию на вирус, можно провести типирование вируса посредством ПЦР.

Свежеиссеченные образцы эмбриональной ткани (кусочки 5x5 мм из легких, печени, тимуса и селезенки) замораживают, делают тонкие срезы на криостате при -20°C, готовят препараты на предметном стекле для микроскопии и фиксируют 100%-ным ацетоном. После высушивания на воздухе срезы инкубируют при 37°C во влажной атмосфере в течение 30 минут с соответствующим разведением конъюгированного свиного антитела против ГВЛ-1. Нереагирующее антитело удаляют двукратным отмыванием в ЗФФР,

затем тканевые срезы покрывают заливочной водной средой и покровным стеклом и исследуют их на флюоресцирующие клетки, которые указывают на присутствие антигена ГВЛ. Каждый тест должен включать положительный и отрицательный контроль, состоящий из срезов от заведомо инфицированной ГВЛ-1 и неинфицированной эмбриональной ткани.

1.5. Выявление вируса посредством иммунопероксидазного окрашивания

Для обнаружения антигена ГВЛ-1 в фиксированных тканях абортированных плодов лошадей, в плацентарной ткани или в материале, полученном от лошадей с неврологическими проявлениями инфекции, были разработаны иммуногистохимические (ИГХ) методы окрашивания, например, использование иммунопероксидазы (Schultheiss *et al.*, 1993; Whitwell *et al.*, 1992). Такие методики можно использовать в качестве альтернативы вышеописанной иммунофлюоресценции выше, кроме того, их легко применять к архивным тканевым образцам. Иммуногистохимическое окрашивание на ГВЛ-1 особенно полезно для одновременной оценки морфологических повреждений и идентификации вируса. Иммунопероксидазное окрашивание на ГВЛ-1/4 также можно выполнять на монослоях инфицированных клеток (van Maanen *et al.*, 2000). В каждый анализ с окрашиванием иммунопероксидазой необходимо включать адекватный контроль для оценки специфичности метода и специфичности антитела. В одной из Справочных лабораторий МЭБ этот метод регулярно используют для анализа замороженной или зафиксированной ткани с применением поликлональной сыворотки кролика против ГВЛ-1. Этот метод окрашивания не является типоспецифичным, поэтому для дифференциации между ГВЛ-1 и ГВЛ-4 его необходимо дополнять выделением вируса или ПЦР, однако он полезен для быстрого диагноза ГВЛ в случае аборта.

1.6. Гистопатология

Необходимо проводить гистопатологическое исследование фиксированных срезов плаценты, легких, печени, селезенки, надпочечников и тимуса, полученных из абортированного материала, а также тканей головного и спинного мозга от лошадей с неврологическими проявлениями инфекции. У абортированных плодов внутридерные включения эозинофильных телец в бронхиолярный эпителий или в клетки на периферии печеночного некроза согласуются с диагнозом герпесвирусной инфекции. Характерным микроскопическим повреждением, связанным с невропатией ГВЛ-1, является дегенеративный тромбозный васкулит мелких кровеносных сосудов в головном или спинном мозге (периваскулярное скопление лейкоцитов и инфильтрация воспалительными клетками, пролиферация и некроз эндотелия с формированием тромбов).

2. Серологические тесты

ГВЛ-1 и ГВЛ-4 эндемичны в большинстве частей света, и серопревалентность высока, однако серологическое тестирование парных сывороток может быть полезно для диагностики РПЛ у лошадей. Положительный диагноз основан на демонстрации значительного (четырёхкратного или более) увеличения титров антитела в парных сыворотках, взятых в острой стадии болезни и в период выздоровления. Результаты анализов сывороток, полученных в один и тот же день, в большинстве случаев невозможно интерпретировать с какой-либо степенью уверенности. Начальный образец сыворотки (острая фаза) необходимо получить как можно раньше после начала клинических проявлений болезни, а второй образец (фаза выздоровления) 2-4 недели спустя.

Сыворотки «острой фазы» от кобылиц после аборта или от лошадей с неврологической формой инфекции ГВЛ-1 уже могут содержать максимальные титры антитела против

ГВЛ-1 без увеличения этих титров в сыворотках, собранных в более поздние сроки. В таких случаях серологическое тестирование парных образцов сыворотки от клинически интактных членов когорты в табуне может оказаться полезным для ретроспективной диагностики РПЛ в табуне.

И, наконец, серологическое выявление антител к ГВЛ-1 в сердечной или пуповинной крови либо в других жидкостях лошадиных плодов может иметь диагностическое значение в случаях аборта, особенно, если плод отрицателен на вирусы. При помощи ПЦР в этих тканях можно идентифицировать нуклеиновые кислоты ГВЛ 1/4.

Уровни сывороточного антитела против ГВЛ-1/4 можно определить посредством реакции нейтрализации вируса (РНВ) (Thomson *et al.*, 1976), реакции связывания комплемента (РСК) (Thomson *et al.*, 1976) или ИФА (Crabb *et al.*, 1995). Не существует признанных на международном уровне реактивов или стандартизированных методик для выполнения любого серологического теста на антитела против ГВЛ-1/4; результаты определения титра на одной и той же сыворотке в разных лабораториях могут отличаться. Кроме того, анализы по методикам РСК и РНВ выявляют антитела, которые дают перекрестную реакцию между ГВЛ-1 и ГВЛ-4. Тем не менее, демонстрация четырехкратного или более повышения титра антитела против ГВЛ-1 или ГВЛ-4 при клинической манифестации болезни дает серологическое подтверждение недавнего инфицирования одним из этих вирусов.

Реакция микронейтрализации представляет собой широко применяемый и достаточно чувствительный серологический анализ для выявления антител против ГВЛ-1/4, поэтому он будет подробно описан ниже.

2.1. Реакция нейтрализации вируса

Эту реакцию обычно проводят в 96-луночных микротитрационных планшетах с плоским дном (категория для тканевых культур) с использованием постоянной дозы вируса и двух копий разведения испытуемых лошадиных сывороток. Для каждого разведения сыворотки требуются, по меньшей мере, две дублированные лунки. В качестве разбавителя всегда используют бессывороточный МПС. Вирусный материал известного титра разбавляют непосредственно перед использованием, чтобы он содержал 100 TCID₅₀ (50%-ная инфективная доза для тканевой культуры) в объеме 25 мкл. Монослой клеток E-Derm или RK-13 делают монодисперсными при помощи ЭДТУ/трипсина и ресуспендируют в концентрации 5×10⁵/мл. Обратите внимание на то, что клетки RK-13 можно использовать с ГВЛ-1, но они не проявляют ЦПЭ с ГВЛ-4. В каждый анализ необходимо включать положительные и отрицательные по антителу контрольные лошадиные сыворотки, а также контроль на жизнеспособность клеток, вирусную инфективность и цитотоксичность испытуемой сыворотки. Конечные титры антитела в РНВ вычисляют, определяя величину, обратную самому высокому разведению сыворотки, которое защищает 100% монослоя клеток от разрушения вирусом в обеих дублированных лунках.

Токсичность сыворотки можно наблюдать в образцах от лошадей, повторно привитых коммерческой вакциной, которая получена из ГВЛ-1, выросшего в клетках RK-13. Это может породить трудности в интерпретации результатов реакции при пониженных разведениях сыворотки. Проблему можно преодолеть, используя клетки E-Derm или другую линию почечных клеток, полученную не от кролика.

2.1.1. Процедура тестирования

Надлежащая процедура тестирования проводится следующим образом:

- i) Испытуемые и контрольные сыворотки инактивируют в течение 30 минут в водяной бане с температурой 56°C.
- ii) Во все лунки микротитрационных планшетов для анализа добавляют 25 мкл бессывороточного МПС.
- iii) 25 мкл каждой испытуемой сыворотки пипетируют в дублированные лунки в рядах планшета А и В. Первый ряд служит контролем токсичности сыворотки, а второй ряд представляет первое разведение теста. Делают дублированные разведения каждой сыворотки, начиная с ряда В и продолжая до дна планшета последовательным перемешиванием и переносом 25 мкл в каждый последующий ряд лунок. В каждом планшете можно проанализировать шесть сывороток.
- iv) 25 мкл соответствующим образом разбавленного вирусного материала ГВЛ-1 или ГВЛ-4 добавляют в каждую лунку (100 TCID₅₀ на лунку) кроме тех из лунок ряда А, которые представляют контроль сыворотки для мониторинга ее токсичности в отношении индикаторных клеток. Обратите внимание, что конечные разведения сыворотки после добавления вируса варьируются от 1/4 до 1/256.
- v) Отдельный контрольный планшет должен включать титрование отрицательной и положительной лошадиной сыворотки с известным титром, клеточный контроль (без вируса), вирусный контроль (без сыворотки), а также титрование вируса для того, чтобы вычислить фактическое количество вируса, используемого в анализе.
- vi) Планшеты инкубируют 1 час при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂.
- vii) В каждую лунку добавляют 50 мкл подготовленной суспензии клеток E-Derm или RK-13 (5Ч10⁵ клеток/мл) в МПС/10% ЭТС.
- viii) Планшеты инкубируют 4-5 дней при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO₂.
- ix) Планшеты микроскопически исследуют на ЦПЭ и записывают результаты в рабочую таблицу. В альтернативном варианте монослой клеток можно проанализировать на ЦПЭ после фиксации и окрашивания следующим образом: после удаления культуральной жидкости культуры планшеты погружают на 15 минут в раствор из 10% формалина, 45% метанола и 45% воды, содержащий 2 мг/мл красителя кристаллический фиолетовый. Затем планшеты энергично промывают под струей проточной водопроводной воды.
- x) Лунки с неповрежденными монослоями клеток окрашиваются в синий цвет, тогда как монослои, разрушенные вирусом, не окрашиваются. Убедитесь в том, что лунки с клеточным контролем, положительным сывороточным контролем и контролем цитотоксичности сыворотки окрашены в синий цвет, лунки с вирусным контролем и отрицательным сывороточным контролем не окрашены, а фактическое количество вируса, добавленное в каждую лунку составляет от 10^{1.5} до 10^{2.5} TCID₅₀. Лунки считают положительными на нейтрализацию вируса, если неповрежденным остается 100% монослоя клеток. Конечной точкой титра для этой сыворотки является ее самое большое разведение, приводящее к полной нейтрализации вируса (отсутствие ЦПЭ) в обеих дублированных лунках.
- xi) Для каждой испытуемой сыворотки рассчитывают титр нейтрализации и сравнивают титры для каждого животного в острой фазе болезни и на стадии выздоровления, чтобы отследить четырехкратное или более увеличение титра.

С. ПОТРЕБНОСТЬ В ВАКЦИНАХ

1. Предпосылки

Для использования у лошадей доступны как живые аттенуированные, так и инактивированные вакцины, которые лицензированы, поступают в продажу и предназначены для уменьшения патологических проявлений болезни лошадей, вызванной инфекцией ГВЛ-1/4. Эти продукты содержат различные пермутации ГВЛ-1 и ГВЛ-4, а некоторые из них также включают лошадиный вирус гриппа.

Клинический опыт свидетельствует о том, что вакцинация полезна для ослабления клинических симптомов респираторного заболевания и уменьшения частоты аборт, однако ни одна из вакцин не защищает от неврологических проявлений болезни. Производители современных вакцин, поступающих в продажу, рекомендуют их применение в многократных дозах, которые надо повторять ежегодно. Схемы вакцинации для разных вакцин варьируются.

Показания к применению, перечисленные на этикетках некоторых доступных вакцин от РПЛ, обозначают или профилактику респираторного заболевания, связанного с герпесвирусом, или помощь в предотвращении аборта, или оба целевых назначения. Только четыре вакцинных продукта соответствуют нормативным требованиям для заявки на эффективную защиту от герпесвирусного аборта в результате успешной вакцинации и дают возможность для критической оценки экспериментов на беременных самках лошадей. По имеющимся данным ни один из вакцинных продуктов не способен предотвратить возникновение неврологической болезни, которая иногда развивается при инфекции ГВЛ-1.

Рекомендации для производства ветеринарных вакцин даны в главе 1.1.8 *Принципы Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководящие указания, данные здесь и в главе 1.1.8, носят общий характер и могут быть дополнены специфическими национальными и региональными требованиями.

2. Схема производства вакцин и минимальные требования к ним

2.1. Характеристики посевного материала

Исходный вакцинный вирус (ИВВ) для вакцин РПЛ необходимо получать из штаммов ГВЛ-1 и/или ГВЛ-4, которые были положительно и однозначно идентифицированы как серологическими, так и генетическими тестами. Посевной вирус необходимо размножить в клеточной линии, утвержденной соответствующим распорядительным органом для производства лошадиной вакцины. Для подготовки главного посевного материала вирусов и клеток, предназначенных для использования в производстве вакцины, нужно вести и сохранять полную запись характеристик первоисточника (включая номер изолята, место и год выделения), истории пересевов, среды, используемой для размножения, и т.д.

2.1.1. Биологические характеристики главного посевного материала

Постоянно сохраняемые запасы ИВВ и маточного фонда клеток (МФК), используемых для производства вакцины, надо регулярно проверять на чистоту, безопасность и, применительно к ИВВ, также на иммуногенность.

Обычно предельными допусками при производстве вакцины являются пятый пересев материала из ИВВ и двадцатый пересев из МФК. Результаты всех тестов исходного

посевного материала на контроль качества необходимо регистрировать и рассматривать как часть постоянных записей лицензиата.

2.1.2. Критерии качества

Тесты на чистоту исходного посевного материала включают предписанные процедуры, которые демонстрируют свободу вирусного и клеточного посевного материала от бактерий, грибков, микоплазм и посторонних вирусов. Необходимо выполнить специальные тесты для того, чтобы подтвердить отсутствие вируса артериита лошадей, вируса инфекционной анемии лошадей, вируса гриппа лошадей, герпесвируса лошадей - 2, -3 и -5, вирусов А и В ринита лошадей, альфа-вируса энцефаломиелита лошадей, вируса диареи крупного рогатого скота (ВДКРС - частого загрязнителя бычьей сыворотки), и свиного парвовируса (СПВ - потенциального загрязнителя свиного трипсина). Проверка чистоты также подразумевает исключение ГВЛ-1 в ИВВ ГВЛ-4 и наоборот.

2.1.3. Аттестация в качестве вакцинного штамма

Тестирование иммуногенности запасов ИВВ ГВЛ-1/4 надо проводить на лошадях с экспериментальной испытуемой вакциной, которая изготовлена на самом высоком уровне пересева из ИВВ, допущенного для использования в производстве вакцины. Тест на иммуногенность ИВВ состоит из вакцинации лошадей с низкими титрами антител против ГВЛ-1/4, используя такие дозы испытуемой вакцины, которые будут рекомендованы на этикетке конечного продукта. Second serum samples should be obtained and tested for significant increases in neutralising antibody titre against the virus, 21 days after the final dose.

Образцы каждой партии ИВВ, предназначенного для приготовления аттенуированных живых вакцин РПЛ, надо протестировать на безопасность на лошадях, восприимчивых к вирулентному вирусу дикого типа, включая беременных кобылиц на последних 4 месяцах беременности. Безопасность вакцины необходимо продемонстрировать в «полевых испытаниях» на лошадях разного возраста из трех различных географических областей. Испытание на безопасность должны проводить независимые ветеринары с использованием предлицензионной партии вакцины. Вакцины ГВЛ-1 с патентной заявкой на эффективное предотвращение абортов надо проверять на безопасность в большой по численности выборке кобылиц на поздних сроках беременности, используя график вакцинации, который будет рекомендован производителем для конечного вакцинного продукта.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Подробный протокол методов производства, которые будут применены при изготовлении вакцин РПЛ, должен быть компилирован, утвержден и зарегистрирован в соответствующем агентстве по лицензированию как схема производства. Специфические особенности методов производства вакцин РПЛ будут различными в зависимости от производителя, а также от типа каждого индивидуального вакцинного продукта (живой или инактивированный) и его состава (только ГВЛ-1, ГВЛ-1 и ГВЛ-4, вирусы ГВЛ-4 и лошадиного гриппа, и т.д.).

2.2.2. Потребность в ингредиентах

Клетки, вирус, культуральная среда и добавки к среде животного происхождения, которые используются для изготовления производственных партий вакцины, должны быть получены из первоначальных запасов, прошедших предписанное тестирование на

стерильность от бактерий, грибов и микоплазм, отсутствие канцерогенности и посторонних патогенных вирусов.

2.2.3. Тестирование партий конечного продукта

i) Стерильность

Образцы, взятые из каждой партии готовой вакцины, проверяют загрязнение бактериями, грибами и микоплазмами. Также требуются процедуры, нацеленные на то, чтобы установить отсутствие в вакцине посторонних вирусов; такие тесты должны включать инокуляцию клеточных культур, позволяющую выявить частые лошадиные вирусы, а также методики для обнаружения ВДКРС и СПВ в ингредиентах животного происхождения, используемых в производстве партии вакцины.

ii) Идентичность

Тесты на идентичность должны продемонстрировать отсутствие других вакцинных штаммов, если в лаборатории, производящей поливалентные вакцины, размножают несколько штаммов.

iii) Безопасность

Тестирование на безопасность включает выявление любых аномальных местных или неблагоприятных системных реакций на вакцину у биологических видов хозяина при всех способах вакцинации. Тесты, гарантирующие безопасность каждой производственной партии вакцины РПЛ, должны продемонстрировать полную инактивацию вируса (для инактивированных вакцин), а также остаточный уровень агента, убивающего вирус, не превышающий максимально допустимый предел (например, 0,2% для формальдегида).

iv) Активность партии

Активность партии исследуют на готовом конечном продукте. Проверка партии на антигенную активность только для вакцин ГВЛ-1 может быть проведена при количественной оценке способности серийных разведений вакцины защищать хомяков от провокации летальной дозой вируса ГВЛ-1, адаптированного к хомякам. Тестирование активности производственных партий вакцины РПЛ также можно проводить посредством вакцинации восприимчивых лошадей с последующим анализом на сероконверсию, но недавно появившаяся доступность моноклональных антител, типоспецифических для вируса, сделала возможной разработку менее дорогостоящих и ускоренных иммуноанализов на антигенную активность *in-vitro*. Основой для таких анализов вакцины РПЛ на активность *in-vitro* является определение при помощи специфического моноклонального антитела присутствия в каждой партии вакцины, по меньшей мере, минимального количества вирусного антигена, которое коррелируется с необходимым уровнем защиты (или степенью сероконверсии) в стандартном тестировании активности на животных.

2.3. Потребность в авторизации/регистрации/лицензировании

2.3.1. Производственный процесс

Для регистрации вакцины все важные детали, относящиеся к производству вакцины и контролю качества (см. разделы С.2.1 и С.2.2) должны быть представлены распорядительным органам. Такую информацию необходимо предоставить по трем последовательным партиям вакцины в объеме не менее 1/3 типичной индустриальной партии.

2.3.2 Требования к безопасности

Безопасность вакцины оценивают на вакцинированных животных при помощи различных анализов (см. раздел 2.2.3.iii).

2.3.3 Требования к эффективности

Эффективность вакцины (защитную) оценивают непосредственно на вакцинированных животных, определяя их резистентность к провокации живым патогеном.

2.3.4 Длительность иммунитета

В ходе процедуры лицензирования или получения регистрационного удостоверения производитель может быть обязан продемонстрировать длительность иммунитета (ДИ), индуцированного данной вакциной, или провокацией, или альтернативным тестом в конце заявленного периода защиты.

Тесты для установления длительности иммунитета к ГВЛ-1/4, индуцированного иммунизацией, не требуются для каждой партии вакцины. Опубликованные результаты многих наблюдений свидетельствуют о том, что длительность иммунитета к ГВЛ-1/4, индуцированного вакцинацией, не превышает нескольких месяцев. Эти наблюдения нашли отражение в рекомендациях по частоте ревакцинаций против РПЛ, приведенных на этикетках вакцинных продуктов.

2.3.5 Стабильность

В ходе процедуры лицензирования или получения регистрационного удостоверения производитель может быть обязан продемонстрировать стабильность всех свойств вакцины в конце заявленного периода хранения. Должны быть указаны температура хранения и даны предупреждения о возможном повреждении продукта при его замораживании или недопустимом температурном воздействии окружающей среды.

Прежде чем сделать вывод о стабильности вакцины, по меньшей мере, три производственных партии продукта должны быть проверены на соответствие заявленному сроку хранения. Хранение инактивированных вакцинных продуктов при температуре 4°C обычно позволяет сохранить их начальную антигенную активность, по меньшей мере, в течение 1 года. Лиофилизированные препараты живой вирусной вакцины также стабильны в течение 1 года, если их хранят при температуре 4°C. После восстановления живая вирусная вакцина нестабильна и не подлежит хранению в связи с потерей активности.

Примечание: современные вакцины утверждены для профилактики респираторного заболевания или как вспомогательное средство в предотвращении абортов. До тех пор, пока способность вакцины предотвращать неврологическую болезнь не доказана, вирусы используемые в экспериментах с провокацией, не должны представлять штаммы с потенциалом индуцирования неврологических последствий.

ЛИТЕРАТУРА

ALLEN G.P. (2007). Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 69–72.

ALLEN G.P. & BRYANS J.T. (1986). Molecular epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *In: Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, Vol. 2, Pandey R., ed. Karger, Basel, Switzerland & New York, USA, 78–144.

ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (1999). Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. *Equine Infect. Dis.*, **8**, 129–146.

BORCHERS K. & SLATER J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, **45**, 331–336.

BRYANS J.T. & ALLEN G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. *In: Herpesvirus Diseases of Animals*, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.

CRABB B.S., MACPHERSON C.M., REUBEL G.H., BROWNING G.F., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (1995). A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch. Virol.*, **140**, 245–258.

CRABB B.S. & STUDDERT M.J. (1995). Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv. Virus Res.*, **45**, 153–190.

[DIALLO I.S.](#), [HEWITSON G.](#), [WRIGHT L.](#), [RODWELL B.J.](#) & [CORNEY B.G.](#) (2006). Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **131**, 92–98.

DIALLO, I.S., HEWITSON, G., WRIGHT, L.L., KELLY, M.A., RODWELL, B.J. AND CORNEY, B.G. (2007). Multiplex real-time

PCR for detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet. Microbiol.*, **123**, 93-103.

FRITSCHKE A.K. & BORCHERS K. (2011). Detection of neuropathogenic strains of equid herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Vet. Microbiol.*, **147**, 176-180.

GUNN H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. *Irish Vet. J.*, **44**, 37–40.

GOODMAN L.B., LOREGIAN A., PERKINS G.A., NUGENT J., BUCKLES E.L., MERCORELLI B., KYDD J.H., PALÙ G., SMITH

K.C., OSTERRIEDER N. & DAVIS-POYNTER N. (2007). A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog.*, **3** (11), e160.

HARTLEY C.A., WILKS C.R., STUDDERT M.J. & GILKERSON J.R. (2005). Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *Am. J. Vet. Res.*, **66**, 921–928.

LAWRENCE G.L., GILKERSON J., LOVE D.N., SABINE M. & WHALLEY J.M. (1994). Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J. Virol. Methods*, **47**, 59–72.

NUGENT J., BIRCH-MACHIN I., SMITH K.C., MUMFORD J.A., SWANN Z., NEWTON J.R., BOWDEN R.J., ALLEN G.P. & DAVIS-

POYNTER N. (2006). Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J. Virol.*, **80**, 4047–4060.

O'KEEFE J.S., JULIAN A., MORIARTY K., MURRAY A. & WILKS C.R. (1994). A comparison of the polymerase chain reaction with standard laboratory methods for the detection of EHV-1 and EHV-4 in archival tissue samples. *N.Z. Vet. J.*, **42**, 93–96.

SCHULTHEISS P.C., COLLINS J.K. & CARMAN J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 12–15.

SMITH K.L., LI Y., BREHENY P., COOK R.F., HENNEY P.J., SELLS S., PRONOST S., LU Z., CROSSLEY B.M., TIMONEY P.J. &

BALASURIYA U.B. (2012). Development and validation of a new and improved allelic discrimination real-time PCR assay for the detection of equine herpesvirus-1 (EHV-1) and differentiation of A2254 from G2254 strains in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 1981–1988.

TELFORD E.A.R., WATSON M.S., MCBRIDE K. & DAVISON A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**, 304–316.

TELFORD E.A.R., WATSON M.S., PERRY J., CULLINANE A.A. & DAVISON A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1197–1203.

THOMSON G.R., MUMFORD J.A., CAMPBELL J., GRIFFITHS L. & CLAPHAM P. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.*, **8**, 58–65.

[VAN MAANEN C., VREESWIJK J., MOONEN P., BRINKHOF J. DE BOER-LUIJTZE E. & TERPSTRA C.](#) (2000). Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory, and neurological isolates from EHV1 and EHV4 infections in The Netherlands. *Vet. Q.*, **22**, 88–93.

VARRASSO A., DYNON K., FICORILLI N., HARTLEY C.A., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, **79**, 563–569.

WHITWELL K.E., GOWER S.M. & SMITH K.C. (1992). An immunoperoxidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave techniques. *Equine Vet. J.*, **24**, 10–12.

*
* *

ВНИМАНИЕ: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по диагностике ринопневмонии лошадей (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных* или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики ринопневмонии лошадей, просим Вас обращаться в Справочные лаборатории МЭБ.