

ГЛАВА 3.5.5

ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТ ЛОШАДЕЙ

(Восточный и западный)

РЕЗЮМЕ

Вирусы восточного и западного энцефаломиелиита лошадей принадлежат к роду Alphavirus семейства Togaviridae. Альтернативная инфекция птиц и комаров поддерживает эти вирусы в природе. Болезнь возникает спорадически у лошадей и людей в период с середины лета до поздней осени. Лошади и человек являются тангенциальными тупиковыми хозяевами. У лошадей болезней болезнь характеризуется лихорадкой, отказом от корма и сильным угнетением. В тяжелых случаях у лошадей болезнь прогрессирует до гипервозбудимости, слепоты, нарушения координации, сильной психической депрессии, лежачего положения, конвульсий и гибели. Инфекция вирусом восточного энцефаломиелиита (EEE) зачастую смертельна для лошадей, в то время как вирус западного энцефаломиелиита лошадей (WEE) может вызывать субклиническую и слабую болезнь с уровнем смертности менее 30%. Сообщается, что EEE и WEE вызывают болезнь у домашней птицы, пернатой дичи и бескилевых. Спорадические случаи EEE регистрируются у коров, овец, свиней, оленей и собак.

Идентификация возбудителя: Предварительный диагноз EEE или WEE может быть поставлен, когда восприимчивые лошади демонстрируют характерную сонливость и другие признаки нарушения ЦНС в зонах повышенной активности кровососущих насекомых. Макроскопические поражения отсутствуют. Гистопатологические поражения могут обеспечить предварительный диагноз. Вирус EEE обычно выделяют из мозга, а иногда и из других тканей мертвых лошадей. Однако вирус WEE выделяют редко. Вирусы EEE и WEE можно выделить из полевых образцов посредством инокуляции новорожденным мышам, в куриные яйца с развивающимися эмбрионами, культуры клеток или только что вылупившимся цыплятам. Вирус идентифицируют посредством реакции связывания комплемента (РСК), реакции иммунофлуоресценции или реакции нейтрализация бляшкообразования (НБО). Вирусную РНК EEE и WEE можно также выявить посредством обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией.

Серологические методы: Антитело можно выявить посредством НБО, РТГА, РСК или иммуноферментного анализа с захватом IgM.

Требования к вакцинам: Вакцины против EEE и WEE безопасны и иммуногены. Они производятся на культурах клеток и инактивируются формалином.

А. ВВЕДЕНИЕ

Вирусы восточного энцефаломиелита лошадей (EEE) и западного энцефаломиелита лошадей (WEE) принадлежат к роду Alphavirus семейства Togaviridae. Природная экология сохранения вируса происходит посредством альтернативного заражения птиц и орнитофильных комаров. Вирус EEE также выделяют от змей, которые могут играть роль хозяина-резервуара (Bingham *et al.*, 2012). Клинические признаки болезни могут наблюдаться у человека и лошадей, которые являются тупиковыми хозяевами данных возбудителей. EEE диагностировали в Квебеке и Онтарио (Канада), центральных и восточных регионах Соединенных Штатов Америки (США), на Карибских островах, в Мексике и в Центральной и Южной Америке. Болезнь, вызываемую WEE, регистрировали в западном регионе США и Канада, в Мексике и в Центральной и Южной Америке (Morris, 1989; Reisen & Monath, 1989; Walton *et al.*, 1981). Вирус Highlands J, антигенно родственной вирусу WEE, выделяли в восточной части США. Хотя считается, что вирус Highlands J не вызывает болезни у млекопитающих, его выделили из мозга лошади, умирающей от энцефаломиелита во Флориде (Karabatsos *et al.*, 1988).

Даже не смотря на то, что смертность от WEE ниже, клинические признаки EEE и WEE могут быть идентичными. Болезнь, вызываемая обоими вирусами, также известна под названием сонной болезни. После инкубационного периода 5-14 дней клинические признаки включают лихорадку, отказ от корма и угнетение. Предварительный диагноз заражения вирусом EEE или WEE невакцинированных лошадей может быть поставлен, если в течение лета в умеренном климате или в сезон дождей в тропическом или субтропическом климате, т.е. во время активности комаров, наблюдается характерная сонливость. Однако ряд других болезней, таких как лихорадка Западного Нила и венесуэльский энцефаломиелит лошадей (главы 2.1.24 и 2.5.12, соответственно) дают похожие клинические признаки, и диагноз нужно подтверждать посредством описанных методов диагностики. Заражение лошадей вирусом WEE зачастую наблюдается на широкой географической территории, например, спорадические случаи на площади более 1000 квадратных миль. Заражение вирусом EEE обычно наблюдают на ограниченной географической территории. Отдельные случаи высокой смертности среди выращиваемой в неволе пернатой дичи, в основном, среди фазанов, кекликов, пингвинов и куропаток связываются с заражением EEE, WEE или Highlands J (Morris, 1989; Reisen & Monath, 1989; Tuttle *et al.*, 2005). Большинство случаев заражения домашней птицы энцефаломиелитом вызваны вирусом EEE и имели место штатах на восточном побережье США. Вирус заносится комарами, но передача в стадах происходит в основном в результате расклева пера и каннибализма. Как вирус EEE, так и вирус WEE вызывают смертельную болезнь у бескилевых. У эму, инфицированных вирусами EEE и WEE, наблюдался геморрагический энтерит, а процент заболеваемости и смертности может превышать 85%. Выявлено, что вирусы Highlands J и EEE вызывают угнетение, сонливость, снижение яйценоскости и повышенную смертность среди индеек (Guy, 1997). Сообщается, что вирус EEE вызывает болезнь у коров (McGee *et al.*, 1992; Pursell *et al.*, 1976), овец (Baer *et al.*, 2005), свиней (Elvinger *et al.*, 1996), белохвостых оленей (Tate *et al.*, 2005) и собак (Farrar *et al.*, 2005).

Вирус ЕЕЕ вызывает тяжелую болезнь у человека, с процентом смертности 30-70% и частыми хроническими последствиями у выживших пациентов. WEE обычно слабый у взрослых пациентов, но он может вызывать тяжелую болезнь у детей. Процент смертности составляет от 3 до 14%. Тяжелая инфекция и смерть, вызванные вирусами ЕЕЕ и WEE, регистрировались у сотрудников лабораторий. Лабораторные работы следует проводить при соответствующем уровне биозащиты и сдерживания, определенном в ходе анализа биологического риска (см. Глава 1.1.4 *Биозащита и биобезопасность: Стандарты для контроля биологического риска в ветеринарной микробиологической лаборатории и виварии*). Рекомендуется проводить вакцинацию сотрудников против вирусов ЕЕЕ и WEE (Департамент здравоохранения и социального обеспечения США, 1999). Следует также принимать меры предосторожности во избежание заражения человека при проведении послеубойного обследования лошадей с подозрением на заражение вирусами энцефаломиелита лошадей.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1. Методы тестирования, используемые для диагностики восточного энцефаломиелита лошадей, и их цель

Метод	Цель				
	Свобода поголовья от инфекции	Свобода отдельных животных от инфекции	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции-надзор	Иммунный статус отдельных животных или поголовья после вакцинации
Идентификация возбудителя¹					
ОТ-ПЦР	-	++	+++	-	-
Выделение в культуре клеток	-	++	+++	-	-
Выявление иммунного ответа					
Иммуногистохимия	-	++	+++	-	-
ИФА с захватом IgM	-	+	++	-	-
Реакция нейтрализации бляшкообразования	+++	+	++	+++	+++
Реакция торможения гемагглютинации (парные образцы)	+	++	++	++	++
Реакция фиксации комплемента (парные образцы)	-	+	++	-	-

Ключ: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы значительно ограничивают его использование; - = не подходит для этой цели. Несмотря на то, что не все эти тесты, перечисленные в категории +++ или ++, прошли официальную стандартизацию и валидацию, их стандартная природа и тот факт, что они широко используются без получения сомнительных результатов, делает их приемлемыми.

¹ Рекомендуется использовать комбинацию методов идентификации возбудителя для одного и того же клинического образца

ОТ-ПЦР = обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; ИФА = иммуноферментный анализ.

* Несмотря на то, что методы диагностики западного энцефаломиелита лошадей похожи, не все варианты тестов были тщательно проверены на лошадях, природным образом зараженных WEE.

1. Идентификация возбудителя

Оптимальным методом диагностики EEE или WEE является выделение вируса. Обычно вирус EEE можно выделить из мозга лошадей при условии, что между появлением клинических признаков и гибелью лошади прошло не менее 5 дней. Вирус EEE можно зачастую выделить из ткани мозга даже при высоком титре сывороточных антител. Вирус WEE редко выделяется из тканей инфицированных лошадей. Мозг – это предпочтительная ткань для выделения вируса, но вирус выделяют и из других тканей, например, из печени и селезенки. Рекомендуется отобрать полный набор этих тканей в двух экземплярах, один набор для выделения вируса, а другой набор, зафиксированный формалином, для гистопатологического исследования. Препараты для выделения вируса следует отправлять охлажденными, если есть возможность их доставки в лаборатории в течение 48 часов после отбора; в противном случае, их следует заморозить и отправить на сухом льду. Полный набор тканей позволит использовать методы диагностики других болезней. Для выделения вируса приготавливают 10% суспензию ткани в фосфатно-буферном солевом растворе (ФБР), pH 7,8, содержащем альбумин бычьей сыворотки (БСА) (объемная доля 0,75%), пенициллин (100 ед/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Суспензию очищают посредством центрифугирования при 1500 g в течение 30 минут.

Вирусы EEE и WEE можно выделить в ряде клеточных культур. Наиболее часто используемые культуры – первичные куриные или утиные фибробласты, перевиваемые культуры клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero), почки кролика (RK-13) или почки новорожденного хомяка (ВНК-21). Попытку выделения вируса обычно проводят в культуральных флаконах на 25 см². Сливающиеся клетки инокулируют с 1,0 мл тканевой суспензии. Через 1-2 часа абсорбции добавляют поддерживающую среду. Культуры инкубируют в течение 6-8 дней, производится один слепой пассаж. Вирусы EEE и WEE производят цитопатические изменения в культуре клеток. Культуры, кажущиеся инфицированными, замораживают. Жидкость, полученную в результате размораживания культур, используют для идентификации вируса.

Новорожденные мыши также считаются чувствительной системой хозяина. Одному или двум выводкам 1-4-дневных мышат вводят 0,02 мл инокулята, используя иглу 26 G 3/8 дюйма (9,3 мм), прикрепленную к 1 мл шприцу для введения туберкулина. Место введения сбоку от средней линии в средней части бокового полушария. За мышами наблюдают в течение 10 дней. Мышей, погибших в течение 24 часов после инокуляции, отбраковывают. Со 2 по 10 день после инокуляции мертвых мышей ежедневно собирают и замораживают при температуре - 70°C. Мозг мышей собирают для идентификации вируса посредством аспирации с использованием иглы 20 G 1 дюйм (2,5 см), прикрепленном к шприцу для введения туберкулина на 1 мл. Второй пассаж производится, только если вирус невозможно идентифицировать у мышей, погибших после инокуляции.

При использовании для первичного выделения вирусов EEE и WEE куриный эмбрион считается менее чувствительным, чем новорожденные мыши. Суспензии ткани можно водить

через желточный мешок яиц с 6-8-дневными развивающимися эмбрионами. Диагностические признаки или поражения эмбрионов, инфицированных этими вирусами, отсутствуют. Инокулированных эмбрионов следует инкубировать в течение 7 дней, но гибель обычно наступает в период со 2 по 4 день после инокуляции. Обычно проводится только один пассаж кроме случаев, когда имеются мертвые эмбрионы, из которых нельзя выделить вирус. Только что вылупившиеся цыплята являются восприимчивыми и используются для выделения вируса. При использовании этого метода следует принимать меры предосторожности во избежание контактов лабораторного персонала, т.к. инфицированные птицы могут распространять высоко инфекционный вирус.

Вирусы EEE или WEE можно идентифицировать в мозгу инфицированных мышей или цыплят, в культуральной жидкости или в амниотической аллантоисной жидкости посредством реакции фиксации комплемента. 10% суспензию приготавливают в вероналовом (барбиталовом) буфере; яичные и культуральные жидкости используют неразведенными или разведенными 1/10 в вероналовом буфере. Жидкость или суспензию центрифугируют при 9000 g в течение 30 минут, а супернатантную жидкость тестируют к гипериммунной сыворотке или мышинной асцитической жидкости, приготовленной против вирусов EEE или WEE, используя стандартную процедуру фиксации комплемента (Министерство здравоохранения, просвещения и социального обеспечения США, 1974). Реакция фиксации комплемента требует инкубирования сывороточного антигена с 7 единицами комплемента в течение ночи при температуре 4°C. Вирус можно идентифицировать в культуре клеток посредством прямого иммунофлуоресцентного окрашивания. Реже используется метод идентификации вируса посредством реакции нейтрализации, что показано ниже.

Описано использование методов обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) для выявления нуклеиновых кислот вирусов EEE, WEE и VEE у комаров и в тканях позвоночных, хотя немногие были широко валидированы на образцах от млекопитающих (Lambert *et al.*, 2003; Linssen *et al.*, 2000; Monroy *et al.*, 1996; Vodkin *et al.*, 1993). Метод мультиплексной ОТ-ПЦР разработан для того, чтобы облегчить дифференциальную диагностику в случае подозрения на EEE или арбовирусный энцефалит Западного Нила у лошадей (Johnson *et al.*, 2003). Данный анализ увеличил скорость и чувствительность в сравнении с выделением вируса на культуре клеток, и он эффективно используется в США уже в течение нескольких последних сезонов циркуляции арбовируса. В последнее время сообщается об использовании комбинации ОТ-ПЦР и иммуноферментного анализа (ИФА: ОТ-ПЦР-ИФА) в качестве метода идентификации альфа-вирусов, патогенных для человека (Wang *et al.*, 2006).

Для надзора за EEE среди комаров разработан ИФА с захватом антигена. Его можно использовать в тех странах, где отсутствуют возможности для выделения вируса или проведения ОТ-ПЦР (Brown *et al.*, 2001). Иммуногистохимические (ИГХ) процедуры очень подходят для диагностики EEE, т.к. они проводятся на зафиксированных тканях (Pennick *et al.*, 2012). Мишенью ИГХ является оболочечный белок вируса EEE. Исследуются некротические и воспаленные области мозга. У инфицированных вирусом EEE лошадей положительное окрашивание наблюдается, в основном, в нейронах и в ассоциированных дендритных процессах.

2. Серологические тесты

Серологическое подтверждение инфекции вирусом EEE или WEE требует четырехкратного или больше повышения или понижения титра антител в парных образцах сыворотки, отобранных 10-14 днями ранее. Большинство лошадей, инфицированных вирусом EEE или WEE, демонстрируют высокий титр антител, если наблюдаются клинические признаки. Следовательно, предварительный диагноз может быть поставлен, если невакцинированная лошадь с соответствующими клиническими признаками имеет антитела только к вирусу EEE или WEE. Выявление антитела IgM посредством ИФА может также обеспечить предварительный диагноз острой инфекции (Sahu *et al.*, 1994). Реакция нейтрализации бляшкообразования (НБО) или, предпочтительно, комбинация НБО и реакции торможения гемагглютинации (РТГА) является процедурой, наиболее часто используемой для выявления антител к вирусам EEE или WEE. Может наблюдаться перекрестная реакция между антителами к EEE и WEE в НБО и РТГА. Антитела НБО как к EEE, так и к WEE проявляются позже и не персистируют; следовательно, данный тест менее пригоден для серологической диагностики болезни.

2.1. Реакция связывания комплемента (РСК)

РСК часто используется для демонстрации антител, хотя антитела, выявленные в РСК, могут не персистировать также долго, как антитела, выявленные в РТГА или НБО. В качестве антигена обычно используется мозговой экстракт мышей в сахарозе/ацетоне. Положительный антиген инактивируют посредством обработки 0,1%-бета-пропиолактоном.

В отсутствие международной стандартной сыворотки, антиген следует титровать к положительной контрольной сыворотке, приготовленной в локальных условиях. Нормальный антиген или контрольный антиген – это мышинный мозг от неинокулированных мышей, экстрагированный и разведенный таким же образом.

Сыворотки разводят $\frac{1}{4}$ в забуференном вероналом физиологическом растворе, содержащем 1% желатина (VBSG), и инактивируют при температуре 56°C в течение 30 минут. Титрацию положительных сывороток можно проводить с использованием дополнительных двукратных разведений. Антигены, полученные в РСК, и контрольный антиген (нормальный мозг мыши) разводят в VBSG до оптимального объема связывания, определенного посредством титрования к положительной сыворотке; комплемент морской свинки разводят в VBSG до получения 5 гемолитических единиц комплемента – 50% (CH_{50}). Реакцию сывороток, антигена и комплемента проводят на 96-луночных круглодонных микротитрационных планшетах при температуре 4°C в течение 18 часов. Овечьи эритроциты (SRBC) доводят до концентрации 2,8%. Гемолизин титрируют для определения оптимального разведения партии используемого комплемента. Гемолизин используется для сенсibilизации 2,8% SRBC и сенсibilизированные клетки добавляют во все лунки микротитрационного планшета. Планшеты инкубируют в течение 30 минут при температуре 37°C. Затем планшеты центрифугируют (200 g) и лунки осматривают на предмет наличия гемолиза. Используются следующие контроли: (a) сыворотка и контрольная сыворотка, каждая с 5 CH_{50} и 2,5 CH_{50} комплемента; (b) РСК антиген и контрольный антиген, каждый с 5 CH_{50} и 2,5 CH_{50} комплемента; (c) разведения комплемента 5 CH_{50} , 2,5 CH_{50} и 1,25 CH_{50} ; и (d) лунки с клеточным контролем только с разбавлением SRBC и VBSG. Эти контроли тестируют на

антикомплементарную сыворотку и антикомплиментарный антиген, активность комплемента, используемого в тесте и целостность индикаторной системы SRBC в отсутствие комплемента, соответственно.

Во избежание антикомплементарных эффектов, сыворотки следует отделить от крови как можно скорее. Положительные и отрицательные контрольные сыворотки следует использовать в тесте.

2.2. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Антиген для РТГА тот же, что описан выше для РСК. Антиген разводят в такой степени, чтобы объем, используемый для каждой гемагглютинирующей единицы (ГАЕ), составлял от четырех- до восьмикратного объема, агглютинирующего 50% эритроцитов в тест-системе. Титр гемагглютинации и оптимальный pH каждого антигена определяются гусиными эритроцитами, разведенными в pH растворах в диапазоне от pH 5,8 до pH 6,6, с интервалами 0,2.

Сыворотки разводят 1/10 в боратном физиологическом растворе, pH 9,0, а затем инактивируют при температуре 56°C в течение 30 минут. Обработка каолином используется для удаления неспецифических сывороточных ингибиторов. В качестве альтернативы, неспецифические ингибиторы можно удалить посредством обработки ацетоном сыворотки, разведенной 1/10 в ФБР, после восстановления в боратном физиологическом растворе. Перед использованием сыворотки следует абсорбировать посредством инкубирования с 0,05 мл объема отмытых осажденных гусиных эритроцитов в течение 20 минут при температуре 4°C.

После тепловой инактивации, обработки каолином и абсорбции приготавливают двукратные разведения обработанной сыворотки в боратовом физиологическом растворе, pH 9,0, с 0,4% бычьего альбумина. Разведения сыворотки (0,025 мл/лунка) приготавливают на 96-луночном круглодонном микротитрационном планшете в двукратных разведениях боратовым физиологическим раствором, pH 9,0, с 0,4 % бычьего альбумина. Антиген (0,025 мл/лунка) добавляется к сыворотке. Планшеты инкубируют при температуре 4°C в течение ночи. Эритроциты получают от нормальных белых гусаков² и трижды отмывают в смеси декстроза/желатин/веронал (DGV), и в DGV готовят 7,0% суспензию. Затем 7,0% суспензию разводят 1/24 в соответствующем pH растворе, и 0,05 мл незамедлительно добавляют на планшеты. Планшеты инкубируют в течение 30 минут при температуре 37°C. Положительные и отрицательные контрольные сыворотки включаются в каждый тест. Тест считается обоснованным, только если контрольные сыворотки дают ожидаемые результаты. Титры 1/10 и 1/20 обозначают подозрение, а титры 1/40 и выше – положительный результат.

2.3. Твердофазный иммуноферментный анализ

ИФА проводится на сенсibilизированных плоскодонных планшетах с антилошадиным иммобилизованным антителом IgM (Sahu *et al.*, 1994). Антитело разводят в соответствии с рекомендациями производителя в 0,5 М в карбонатного буфера, pH 9,6, и по 50 мкл вносят в каждую лунку. Планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа, а затем при

² Предпочтительно использовать эритроциты от взрослых белых домашних гусаков, но можно использовать эритроциты и от других гусаков. Если использовать клетки от гусынь, может наблюдаться большая вариабельность теста. Сообщается, что эритроциты петуха вызывают понижение чувствительности теста.

4°C в течение ночи. Перед использованием сенсibilизированные планшеты трижды отмывают 200-300 мкл/лунка 0,01 М ФБР, содержащего 0,05% Tween 20. После второй промывки в каждую лунку добавляют 200 мкл ФБР/Tween/5% обезжиренного сухого молока, и планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубирования планшеты вновь трижды отмывают ФБР/Tween. Тестовую и контрольную сыворотки разводят 1/400 в 0,01 М ФБР, рН 7,2; содержащим 0,05% Tween 20, и по 50 мкл добавляют в каждую лунку. Планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение 90 минут, а затем трижды отмывают. Затем добавляют 50 мкл вирусного антигена во все лунки. (Разведение антигена зависит от его источника и определяется эмпирическим путем). Планшеты инкубируют в течение ночи при температуре 4°C и трижды промывают. Затем добавляют 50 мкл моноклонального антитела (Mat) к вирусу энцефалита³, конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшеты инкубируют в течение 90 минут при температуре 37°C и промывают шесть раз. В итоге, добавляют 50 мкл свежеприготовленного субстрата АВТС (2,2' - Азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты + перекись водорода), и планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 15-40 минут. Поглощаемость тестовой сыворотки измеряется на уровне 405 нм. Тестовый образец считается положительным, если абсорбция тестовых образцов в лунках с вирусным антигеном, по крайней мере, в два раза превышает абсорбцию отрицательной контрольной сыворотки в лунках, содержащих вирусный антиген, а также, по крайней мере, в два раза превышает абсорбцию образца, проанализированного параллельно в лунках, содержащих нормальный антиген.

2.4. Реакция нейтрализации бляшкообразования (НБО)

НБО является очень специфичным и его можно использовать для дифференциации вирусов ЕЕЕ и WEE. НБО проводится на фибробластах утиных эмбрионов, на культурах клеток Vero или ВНК-21 в 25 см³ флаконах или на шестилуночных планшетах. Перечисленные объемы – для флаконов; объем следует поделить на два для лунок на шестилуночных планшетах. Скрининг сывороток можно проводить при итоговом разведении 1/10 и 1/100. Конечные точки можно установить посредством НБО или РТГА. Сыворотку, используемую в НБО, тестируют по 100 бляшкообразующим единицам (БОЕ) вируса (50 БОЕ для шестилуночных планшетов). Смесь вируса и сыворотки инкубируют при температуре 37°C в течение 75 минут до инокуляции на монослой культуры сливающихся клеток в 25 см³ флаконах. Инокулят адсорбируется в течение 1 часа, затем добавляют 6 мл покровной питательной среды. Покровная среда состоит из двух растворов, которые готовят отдельно. Раствор I содержит 2× базовый солевой раствор Эрла без фенола красного, 4% фетальную бычью сыворотку, 100 мкг/мл гентамицина, 200 мкг/мл нистатина, 0,45% раствора двууглекислого натрия и 0,002% нейтрального красного. При использовании фибробластов утиных эмбрионов Раствор I также содержит 6,6% дрожжевого экстракта и лактальбумина гидролизата. Раствор II состоит из 2% очищенного агара, стерилизованного и выдержанного при температуре 47°C. Равные объемы растворов I и II доводят до температуры 47°C и смешивают непосредственно перед использованием. Исследуемые образцы инкубируют в течение 48-72 часов, а конечные точки основывают на 90% снижении количества бляшек по

³ Поставляется: Центры контроля и профилактики заболеваний, Референтные биологические реактивы, 1600 Clifton Road NE, Mail Stop C21, Atlanta, Georgia 30333, Соединенные Штаты Америки.

сравнению с контрольными флаконами, содержащими вирус, в которых должно быть около 100 бляшек.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Обоснование

Инактивированные вакцины против вирусов ЕЕЕ и WEE имеются в продаже. Атенуированные вирусные вакцины против ЕЕЕ и WEE проявили себя удовлетворительно. Вакцины, лицензированные для использования в США, производят, используя следующие комбинации: ЕЕЕ и WEE; ЕЕЕ, WEE и венесуэльский энцефалит лошадей (VEE); и ЕЕЕ и VEE. Кроме того, столбнячный токсин, инактивированный вирус гриппа и инактивированный вирус лихорадки Западного Нила объединяют с ЕЕЕ и WEE или ЕЕЕ, WEE и VEE. Имеющиеся в настоящее время вакцины производят из вируса, размноженного на культуре клеток, и инактивированного формалином (Maire *et al.*, 1970).

Руководство по производству ветеринарных вакцин приводится в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Приведенные ниже и в главе 1.1.8 руководства являются общими и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

2. План производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

Общие требования к исходному вакцинному вирусу и допустимым пассажам для производства вакцины см. в главе 1.1.8. Подходящие партии посевного материала следует держать при температуре -70°C в лиофилизированном состоянии.

2.2.1. Биологические характеристики исходного вакцинного вируса

Стандартные штаммы вирусов ЕЕЕ и WEE выделили более 20 лет назад, и сейчас они используются для производства вакцин, а также доказано, что они производят защитный иммунитет. Штаммы вируса ЕЕЕ, которые различаются антигенно и по молекулярной структуре, идентифицированы в различных регионах. Однако Североамериканские и Карибские изоляты кажутся аналогичными (Weaver *et al.*, 1994). Доказано, что штаммы вируса WEE, выделенные в разных странах, схожи как в анализе Мат, так и в анализе олигонуклеотидов РНК методом отпечатков (Reisen & Monath, 1989). Предпочтителен последний хорошо описанный изолят из страны, где должны использоваться вакцина. Отобранные вирусы должны быть иммуногенными и должны реплицироваться в культуре клеток в высоких титрах.

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

Исходный вакцинный вирус следует протестировать на чистоту, идентичность и отсутствие посторонних веществ до того, как он будет использован для производства вакцины. Исходный вакцинный вирус не должен содержать бактерий, грибов и микоплазм. Исходный вакцинный вирус культивируют на линиях клеток Vero и на клетках лошадиных эмбрионов при подтверждении посредством метода флуоресцирующих антител отсутствия герпесвируса лошадей, аденовируса лошадей, вируса артрита лошадей, вируса вирусной диареи КРС, реовируса и вируса бешенства.

Исходный вакцинный вирус также не должен содержать постороннего вируса по показателям цитопатического действия (ЦПД) и гемадсорбции на культуре клеток Vero и на клетках лошадиных эмбрионов.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

В ходе испытания на иммуногенность исходный вакцинный вирус на уровне наивысшего пассажа, предназначенного для производства, должен доказать эффективность (защиту) при вакцинации/ серологическом исследовании на иммуногенность на морских свинках.

2.1.4. Процедура на случай чрезвычайных обстоятельств при промежуточной приемке нового исходного вакцинного вируса в случае эпизоотии (при патогенах многих серотипов, например, вирус блутанга)

В случае чрезвычайных эпизоотических обстоятельств может быть недостаточно времени для полного исследования нового исходного вакцинного вируса на предмет всех посторонних возбудителей; в такой ситуации промежуточная приемка нового штамма может основываться на анализе риска возможности контаминации антигена, произведенного из нового исходного вакцинного вируса с посторонним возбудителем. Прежде чем принять решение о допуске или запрете досрочного выпуска нового продукта, данная оценка риска должна учитывать характеристики процесса, включая природу и концентрацию инактиванта для инаktivированных вакцин.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Исходный вакцинный вирус следует выращивать на линиях клеток, которые поддерживают рост EEE и WEE. Дополнительные руководства по подготовке и тестированию исходных посевных материалов см. в главе 1.1.8. Лини клеток не должны содержать посторонних вирусов, бактерий, грибов и микоплазм. Выращивание вируса не должно превышать пяти пассажей исходного вакцинного вируса, если не доказано, что дополнительные пассажи обеспечивают достаточные серологические титры у морских свинок.

Восприимчивые линии клеток засеиваются в подходящие сосуды. В качестве производственной среды можно использовать минимальную поддерживающую среду с добавлением фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Инкубирование проводится при температуре 37°C.

Непосредственно на культуры клеток инокулируют рабочий посевной вирус EEE и WEE, который обычно получают в ходе 1-4 пассажей исходного вакцинного вируса. Инокулированные культуры инкубируют в течение 1-3 дней до сбора культуральной среды. Во время инкубирования культуры ежедневно наблюдают на предмет ЦПД и бактериальной контаминации.

Инаktivированные вакцины можно инаktivировать химическим способом с помощью формалина и перемешивания с подходящим адьювантом. Длительность периода инаktivации основывается на продемонстрированной кинетике инаktivации.

Используемые консерванты – тимеросал в разведении 1/1000 и антибиотики (неомицин, полимиксин, амфотерцин В и гентамицин).

2.2.2. Требования к ингредиентам

Все ингредиенты, используемые при производстве вакцин против EEE и WEE, следует определять в соответствующих производственных протоколах, и они должны быть постоянными для всех партий. Общее руководство относительно ингредиентов животного происхождения см. в главе 1.1.8. Ингредиенты животного происхождения должны быть получены из страны с незначительным риском по трансмиссивным губкообразным энцефалопатиям (ТГЭ).

2.2.3 Внутренний контроль

Производственные партии следует ежедневно исследовать на предмет цитопатогенных изменений. После сбора урожая вирусную суспензию следует исследовать на наличие микробных контаминантов. Производственные партии следует титровать в тканевой культуре до инактивации с целью стандартизации продукта. Партии с низким титром можно сконцентрировать или объединить с партиями с высоким титром с целью получения правильного титра.

Инактивированные партии следует тестировать на полноту инактивации на цыплятах в возрасте от 6 до 12 часов.

2.2.4. Тестирование партий конечного продукта

i) Стерильность

Образцы инактивированной и живой вакцины исследуют на предмет бактериальной и грибковой контаминации. Объем используемой в ходе этих тестов среды должен быть достаточным для сведения к нулю бактериостатического или фунгистатического действия консервантов, присутствующих в продукте. При исследовании на бактерии в десять сосудов, каждый из которых содержит 120 мл казеин-соевой питательной среды, вводят 0,2 мл образцов из десяти контейнеров с конечным продуктом. Эти десять сосудов инкубируют при температуре 30-35°C в течение 14 дней и наблюдают рост бактериальных культур. Для тестирования на грибы в десять сосудов, в каждом из которых минимум 40 мл казеин-соевой питательной среды, вводят 0,2 мл образцов из десяти контейнеров с конечным продуктом. Сосуды инкубируют при температуре 20-25°C в течение 14 дней и наблюдают рост грибковых культур. В некоторых странах могут быть другие требования.

ii) Идентичность

Испытания отдельных партий на идентичность следует проводить, если тестирование партии на иммуногенность, например титрация на культуре клеток живых вирус-вакцин, не в достаточной степени подтверждает идентичность возбудителя в вакцине. Тесты на идентичность могут включать анализ флуоресцирующих антител или реакцию сывороточной нейтрализации.

iii) Безопасность

Тестирование партии на безопасность инактивации вируса проводится на цыплятах в возрасте 6-12 часов. Десяти цыплятам подкожно вводят 0,5 мл продукта и наблюдают в течение 10 дней. В случае неблагоприятных реакций партия отбраковывается.

iv) Иммуногенность партии

Исследование на иммуногенность проводится посредством введения каждой из десяти морских свинок вакцинного вируса EEE или WEE в дозе, составляющей половину дозы для лошадей, за два подхода с интервалом 14-21 день способом, рекомендованным для лошадей. Образцы сыворотки каждого вакцинированного животного и каждого контрольного животного тестируют через 14-21 день после введения второй партии дозы, используя НБО. Титры EEE должны составлять $\geq 1/40$, титры WEE должны быть $\geq 1/40$ (Кодекс федеральных правил США) при использовании клеток Vero. Если в ходе НБО используются фибробласты утиных эмбрионов, титры будут ниже. В качестве альтернативы исследованию иммуногенности используется внутрицеребральное контрольное заражение через 14-21 день после второй вакцинации. Каждой морской свинке вводят 0,1 мл вируса, содержащего 100 ЛД₅₀ (50% летальной дозы). Проводится одновременное титрование. Для приемки вакцины 80% морских свинок должны выжить при заражении обоими вирусами.

2.3. Требования к разрешению/регистрации/лицензированию

2.3.1. Производственный процесс

Для регистрации вакцины в органы власти должны быть предоставлены все соответствующие подробные описания производства вакцины и исследования контроля качества (см. Раздел С.2.1 и С.2.2.). Данная информация должна быть предоставлена по трем последовательным партиям вакцины в объеме не менее 1/3 одной обычной промышленной партии.

Внутренние проверки составляют часть производственного процесса.

2.3.2. Требования к безопасности

Конечный состав инактивированной вакцины следует тестировать на ограниченном количестве целевых животных до проведения крупномасштабного исследования в полевых условиях. Конечный состав вакцины не должен вызывать тяжелых нежелательных реакций.

Исследования безопасности в полевых условиях следует проводить до получения конечного разрешения на вакцину. В целом, следует использовать две серии, в трех разных географических точках при типовых условиях выращивания животных и на не менее 600 животных. Вакцину следует вводить в соответствии с рекомендациями на этикетке (включая введение бустерной дозы), и она должна содержать максимальный допустимый объем вирусного антигена (Если максимальное содержание антигена не указано, серии должны иметь прогнозируемую типовую послепродажную иммуногенность). Около одной трети животных должны быть в минимальном возрасте, рекомендованном для проведения вакцинации.

i) Противопоказания (опасности)

Вакцина должна быть признана безопасной и непатогенной для лиц, проводящих вакцинацию. Производителям следует предоставить соответствующие предупреждения о том, что следует обратиться к врачу в случае непроизвольного введения (включая адьюванты, вакцины на основе масляных эмульсий, консерванты и т.д.), причем данные предупреждения следует указать на этикетке продукта/ вкладыше в упаковку с тем, чтобы проводящее вакцинацию лицо знало о любой опасности.

2.3.3. Требования к эффективности

Для регистрации коммерческой вакцины необходимо подтвердить эффективность (защиту) при вакцинации морских свинок/ серологическом тестировании на иммуногенность партии или партий, произведенных в соответствии со стандартным методом и содержащих минимальное количество антигена, или на показатель иммуногенности; каждую последующую коммерческую партию необходимо тестировать перед выпуском в продажу с тем, чтобы гарантировать, что в данной партии показатели иммуногенности такие же, как и в партии (-ях), используемой (-ых) для исследования (-ий) на иммуногенность.

2.3.4. Вакцины, позволяющие использовать стратегию DIVA (выявление инфекции у вакцинированных животных)

Вакцинированные лошади могут проявлять серологический титр, который может служить препятствием при экспорте лошади.

2.3.5. Длительность иммунитета

Результаты соответствующих исследований длительности иммунитета отсутствуют. Ежегодная повторная вакцинация рекомендуется в случае инактивированных вакцин. Жеребят, вакцинированных в возрасте до 1 года, следует повторно вакцинировать перед следующим сезоном лёта переносчиков.

2.3.6. Стабильность

Инактивированная вакцина устойчива и иммуногена в течение 2 лет при хранении в охлажденном виде при температуре 2-7°C. По истечении 2 лет вакцину следует утилизировать.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BAUER R.W., GILL M.S., POSTON R.B. & KIM D. Y. (2005). Naturally occurring eastern equine encephalitis in a Hampshire wether. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 281–285.
- BINGHAM A.M., GRAHAM S.P., BURKETT-CADENA N.D., WHITE G.S., HASSAN H.K. & UNNASCH T.R. (2012). Detection of eastern equine encephalomyelitis virus RNA in North American snakes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **87** (6), 1140–1144.
- BROWN T.M., MITCHELL C.J., NASCI R.S., SMITH G.C. & ROHRIG J.T. (2001). Detection of eastern equine encephalitis virus in infected mosquitoes using a monoclonal antibody-based antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 208–213.

- ELVINGER F., BALDWIN C.A., LIGGETT A.D., TANK K.N., & STALLKNECHT D.E. (1996). Prevalence of exposure to eastern equine encephalomyelitis virus in domestic and feral swine in Georgia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 481–484.
- FARRAR M.D., MILLER D. L.,BALDWIN C.A.,STIVER S. L.& HALL C. L.(2005). Eastern equine encephalitis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 614–617.
- GUY J.S. (1997). Arbovirus Infections. In: *Diseases of Poultry*, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R., & Saif Y.M., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 765–772.
- JOHNSON D.J., OSTLUND E.N. & SCHMITT B.J. (2003). Nested multiplex RT-PCR for detection and differentiation of West Nile virus and eastern equine encephalomyelitis virus in brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 488–493.
- KARABATSOS N., LEWIS A.L., CALISHER C.H., HUNT A.R.& ROEHRIG J.T. (1988). Identification of Highland J virus from a Florida horse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **39**, 603–606.
- LAMBERT A.J., MARTIN D.A. & LANCIOTTI R.S. (2003). Detection of North American eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 379–385.
- LINSSEN B., KINNEY R.M., AGUILAR P., RUSSELL K.L., WATTS D.M., KAADEN O.R. & PFEFFER M. (2000). Development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 527–535.
- MAIRE L.F. III, MCKINNEY R.W. & COLE F.E. Jr (1970). An inactivated eastern equine encephalomyelitis vaccine propagated in chick-embryo cell culture. I. Production and testing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**, 119–122.
- MCGEE E.D., LITTLETON C.H., MAPP J.B. & BROWN R.J. (1992). Eastern equine encephalomyelitis in an adult cow. *Vet. Pathol.*, **29**, 361–363.
- MONROY A.M., SCOTT T.W. & WEBB B.A. (1996). Evaluation of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of eastern equine encephalomyelitis virus during vector surveillance. *J. Med. Entomol.*, **33**, 449–457.
- MORRIS C.D. (1989). Eastern equine encephalomyelitis. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 3, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1–12.
- PURSELL A.R., MITCHELL F.E. & SEIBOLD H.R. (1976). Naturally occurring and experimentally induced eastern encephalomyelitis in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **169**, 1101–1103.
- PENNICK K.E., MCKNIGHT C.A.,PATTERSON J.S., LATIMER K.S., MAES R.K., WISE A.G.&KIUPEL M. (2012). Diagnostic sensitivity and specificity of in situ hybridization and immunohistochemistry for Eastern equine encephalitis virus and West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue of horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24** (2), 333–338.
- REISEN W.K. & MONATH T.P. (1989). Western equine encephalomyelitis. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 5, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 89–137.

SAHU S.P., ALSTAD A.D., PEDERSEN D.D. & PEARSON J.E. (1994). Diagnosis of eastern equine encephalomyelitis virus infection in horses by immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 34–38.

TATE C.M., HOWERTH E.W., STALLKNECHT D.E., ALLISTON, A.B., FISHER J.R. & MEAD D.G. (2005). Eastern equine encephalitis in a free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Wildl. Dis.*, **41**, 241–245.

TUTTLE A.D., ANDREADIS T.G., FRASCA S. JR & DUNN J.L. (2005). Eastern equine encephalitis in a flock of African penguins maintained at an aquarium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **226**, 2059–2062.

UNITED STATES CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2000). Encephalomyelitis vaccine: Eastern and Western killed virus. Title 9, Part 113, Section 113.207. US Government Printing Office, Washington DC, USA, 601–602.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE (1974). A Guide to the Performance of the Standardised Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. (BMBL) 5th Edition.

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>.

VODKIN M.H., MCLAUGHLIN G.L., DAY J.F., SHOPE R.E. & NOVAK R.J. (1993). A rapid diagnostic assay for eastern equine encephalomyelitis viral-RNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 772–776.

WALTON T.E. (1981). Venezuelan, eastern, and western encephalomyelitis. In: *Virus Diseases of Food Animals. A World Geography of Epidemiology and Control. Disease Monographs, Vol. 2*, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, New York, USA, 587–625.

WANG E., PAESSLER S., AGUILAR P.V., CARRARA A.S., NI H., GREENE I.P. & WEAVER S.C. (2006). Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4000–4008.

WEAVER S.C., HAGENBAUGH A., BELLEW L.A., GOUSSET L., MALLAMPALLI V., HOLLAND J.J. & SCOTT T.W. (1994). Evolution of Alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *J. Virol.*, **68**, 158–169.

*

* *

NB: Создана Референтная лаборатория МЭБ по энцефаломиелииту лошадей (восточному и западному) (актуальный список см. в Таблице в Части 4 данного Руководства по наземным животным или на сайте МЭБ:

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

Дополнительную информацию о диагностических тестах, реактивах и вакцинах против энцефаломиелита лошадей (восточного и западного) можно получить в Референтной лаборатории МЭБ