

# Методы диагностики инфекции герпесвирусом лошади-1 (EHV-1) (ринопневмонита )

王科珂 乌鲁木齐海关技术中心

Центр технологий Урумчинской таможни  
Кеке Ванг



# 目录 Содержание

01

## 病原概述

Обзор возбудителя  
заболевания

02

## 病原学检测方法

Идентификация возбудителя

03

## 血清学检测方法

Серологические тесты

# 马鼻肺炎概述

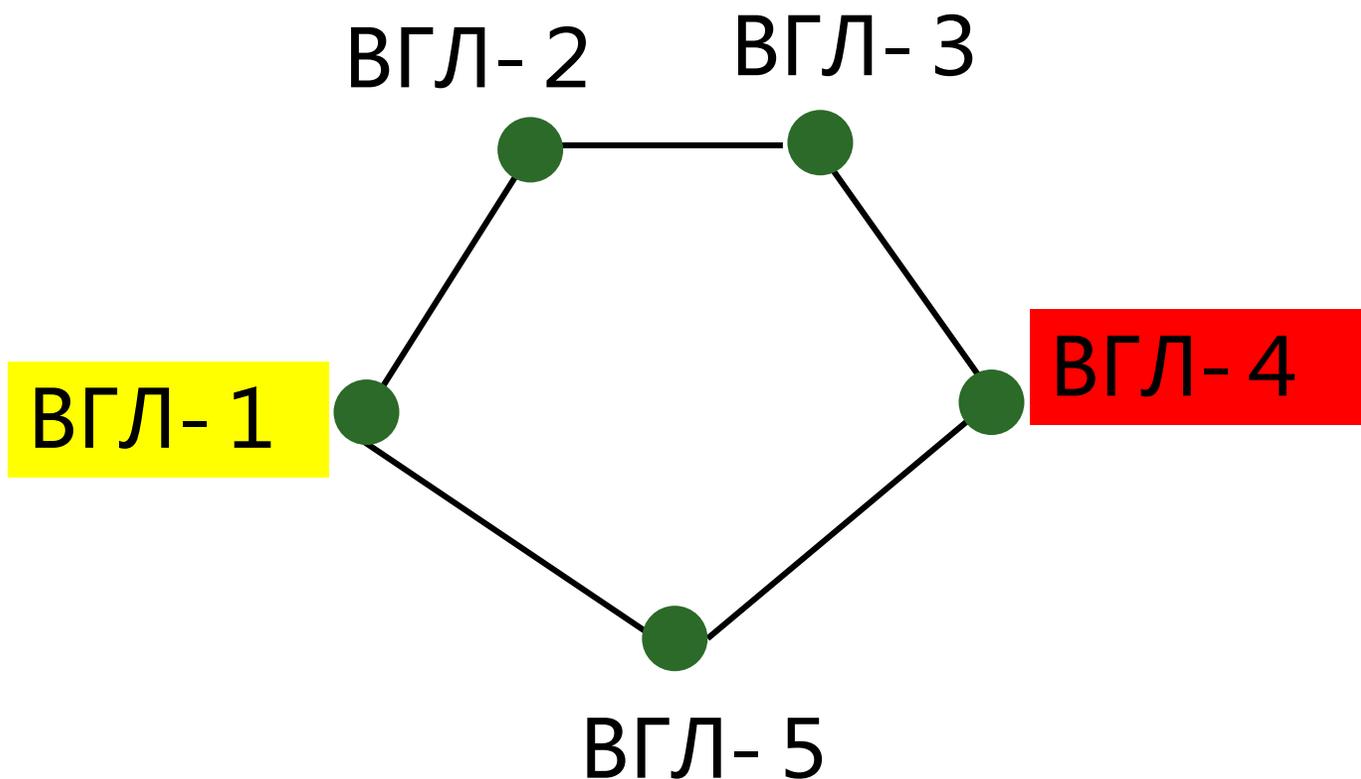
## Ринопневмония лошадей

Ринопневмония лошадей (РЛ) - это высококонтагиозное инфекционное заболевание лошадей, вызываемое вирусом герпеса лошадей типа 1 (ВГЛ-1) и типа 4 (ВГЛ-4). Лошади, зараженные этим заболеванием, страдают от аборт, респираторных и неврологических заболеваний и могут погибнуть. Часто проявляются разные клинические симптомы из-за разницы во времени иммунизации лошадей или разницы в возрасте.

Ринопневмония лошадей широко распространена в стадах лошадей во всем мире, независимо от возраста и популяции на момент заражения, что наносит серьезный вред развитию коневодства. Так как это одно из важных заболеваний лошадей, МЭБ классифицирует его как болезнь животных категории В. Китай классифицирует его как инфекционное заболевание животных второго класса и одно из обязательных подкарантинных заболеваний для лошадей, ввозимых и вывозимых из страны.



# 病原 Антиген



## (Вирус герпеса лошадей, ВГЛ)

Он относится к вирусам ветряной оспы семейства herpesviridae. В классификации существует много типов ВГЛ, но 5 типов могут инфицировать лошадей. ВГЛ-1 попадает в тело лошади, а затем входит в кровоток, вызывая токсемию, которая затем распространяется на различные органы лошадей и может вызывать респираторные симптомы, неврологические симптомы и аборт у лошадей.

После того, как ВГЛ-4 заражает лошадей, вирус размножается в только дыхательных путях лошади, вызывая у лошади респираторные симптомы.

После совместного заражения лошадей ВГЛ-1 и ВГЛ-4 часто можно обнаружить один и тот же антиген.

# 临床症状

## Клинические симптомы

Клинические симптомы больных лошадей различны, как правило, лихорадка, депрессия, потеря аппетита, насморк, слезотечение, конъюнктивит, отек век, отек нижних лимфатических узлов под челюстью, уменьшение лейкоцитов, отек конечностей, особенно нижних конечностей; отек мошонки и крайней плоти лошадей-самцов, аборт у жеребых кобыл. Более серьезные симптомы у старых кобыл и плохо питающихся лошадей, у жеребых кобыл больше симптомов, чем у яловых. Если эпидемия ВАЛ (вирусный артериит лошадей) происходит в табуне жеребых лошадей, частота абортов может достигать от 40% до 59%.



# Тестирование на патогены

Сбор и подготовка образцов

ПЦР  
Полимеразная цепная реакция

Изоляция вируса



Прямое иммунофлуоресцентное обнаружение

Окрашивание иммунопероксидазой

Гистопатология

# Изоляция вируса

## Сбор образцов

Мазок из носоглотки, МКПК  
Печень, легкое, тимус и селезенка  
(от абортрованного плода)  
Ткань центральной нервной системы  
(при заболеваниях нервной системы)

**Перевозка образца**  
Погружен в 3 мл PBS или MEM

## Подготовка клеток

ВГЛ-1: Индекс ВНК-21 (RK-13)  
ВГЛ-4: фетальные клетки почек лошади или фибробласты лошади

## Обработка образцов

Стерильный шприц-фильтр с мембраной 0,45 мкм  
(Серьезное бактериальное заражение)

## Насадка для засева

Поместить обработанный образец в монослой клеток и инкубировать при 37°C. После промывания PBS добавить 2% фетальную бычью сыворотку MEM.  
(в два раза больше стандартной концентрации антибиотиков) Продолжать культивирование при 37°C.

## Культивирование однослойных клеток 5% CO2 37°C

## Наблюдение за поражением

Характерный цитопатический эффект вируса герпеса (CPE)  
Через 5-6 дней появляется CPE, и будет оцениваться после идентификации ПЦР.

## Слепой проход

Отсутствие CPE в течение 7 дней, продолжать слепой перенос культуральной среды и монослойных клеток

## Определение

Вторая слепая передача отрицательна без CPE

# ПЦР Полимеразная цепная реакция

## Сбор образцов

1. Ткани новорожденных и абортировавших взрослых животных (включая ткани легких, печени, селезенки, тимуса, надпочечников и плаценты)
2. Мазок из носоглотки лошади (требуется транспортная среда, такая как PBS), жидкость для лаважа трахеи (TW) или бронхоальвеолярный лаваж (BAL)



Выделение ДНК с использованием набора для выделения вирусов или оборудования для автоматической экстракции нуклеиновых кислот



EHV 1 Forward: GGG-GTT-CTT-AAT-TGC-ATT-CAG-ACC

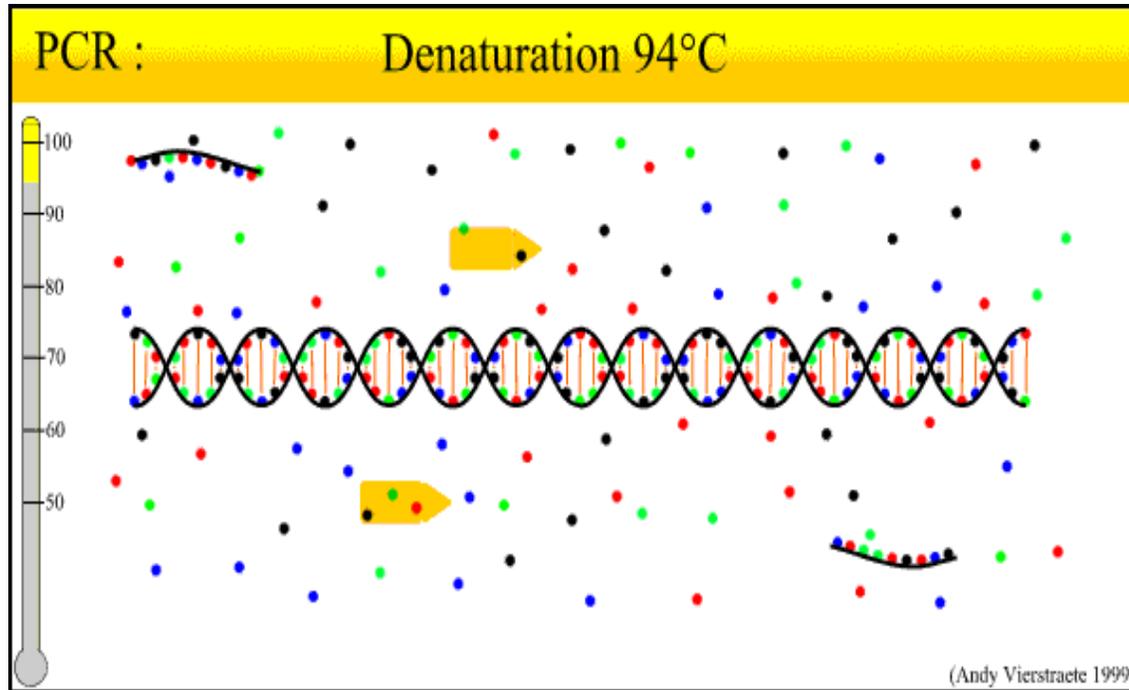
EHV 1 Reverse: GTA-GGT-GCG-GTT-AGA-TCT-CAC-AAG

EHV 4 Forward: TAG-CAA-ACA-CCC-ACT-AAT-AAT-AGC-AAG

EHV 4 Reverse: GCT-CAA-ATC-TCT-TTA-TTT-TAT-GTC-ATA-TGC

EHV1gB/probe: {FAM}TCT-CCA-ACG-AAC-TCG-CCA-GGC-TGT-ACC{BHQ1}

EHV4ORF17/probe: {JOE}CGG-AAC-AGG-AAC-TCA-CTT-CAG-AGC-CAG-C{BHQ1}

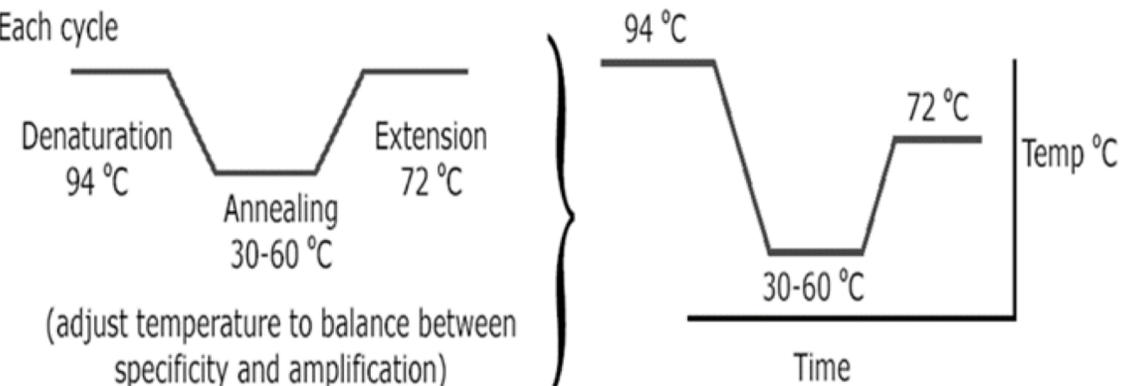


PCR reaction contains

- Target DNA (example: environmental DNA)
- 2 primers (20-30 nts long)
- Thermostable DNA polymerase
- Nucleotides (dNTPs)
- $Mg^{2+}$  (cofactor for DNA polymerase)

Mix is subjected to temperature cycling

Each cycle



# Прямая иммунофлуоресценция

Метод быстрой предварительной диагностики антигена ВГЛ в образцах тканей. Приготовленную эффективную поликлональную антисыворотку против ВГЛ-1 комбинируют с ФИТЦ.



Преимущества: Диагностическая надежность технологии близка к надежности изоляции вирусов.

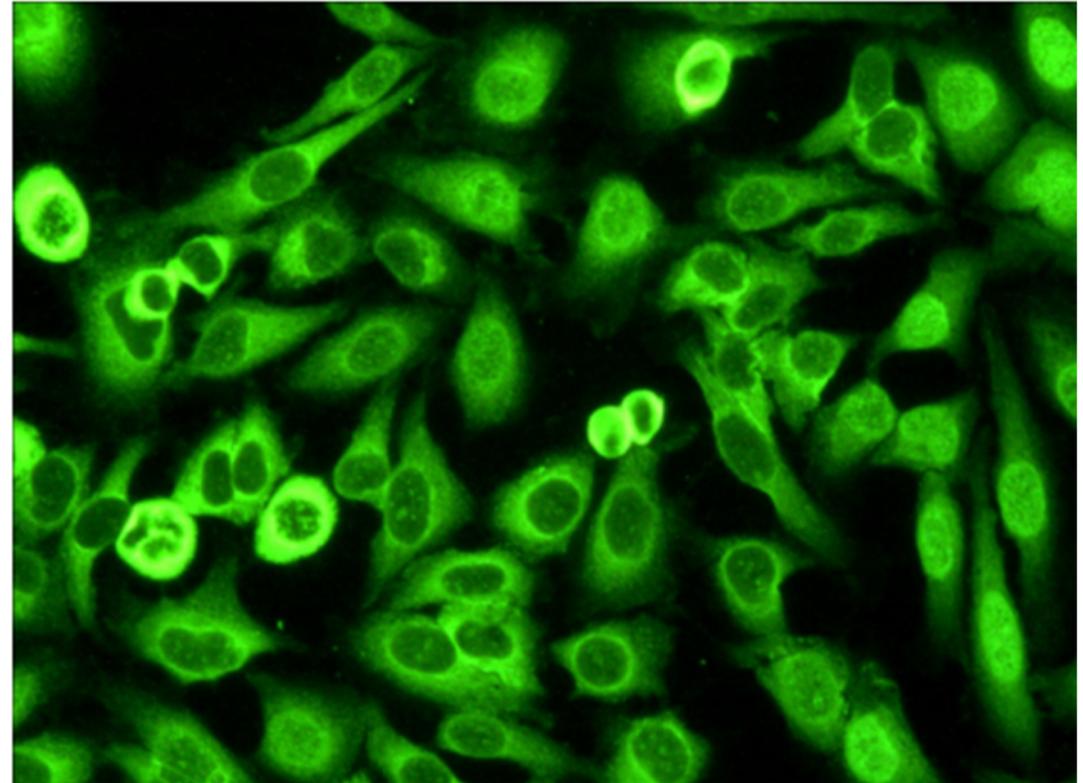
Недостатки: не подходит для серотипирования, необходимо идентифицировать с помощью ПЦР



# Прямая иммунофлуоресценция

1. Образцы свежесрезанных тканей плода (легкие, печень, тимус и селезенка) (срезы 5 × 5 мм) заморозить и разрезать на криостате при -20°C.
2. Зафиксировать на предметных стеклах 100% ацетоном
3. После высыхания добавить соответствующее связывающее ВГЛ-1 антитело и инкубировать срезы во влажной среде при 37°C в течение 30 минут.
4. Дважды промыть PBS, чтобы удалить непрореагировавшие антитела.
5. Покрыть ткань водной средой и раствором, закрыть покровным стеклом
6. Обратит внимание на наличие флуоресцентных клеток, которые указывают на антиген ВГЛ.

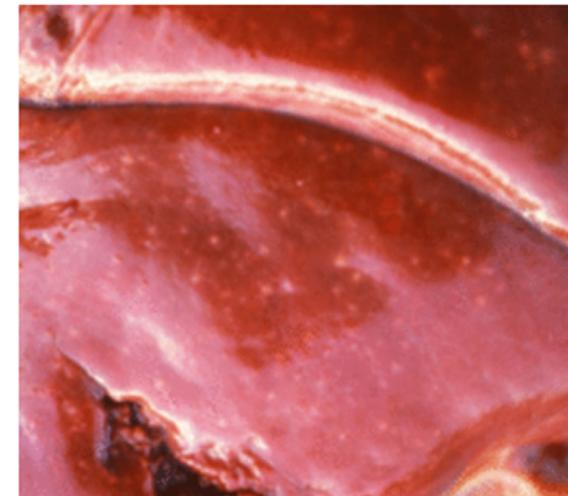
Прим.: Каждый тест должен включать положительные и отрицательные контроли, такие как: известная инфекция ВГЛ-1 и неинфицированная ткань плода.



# Гистопатологическое исследование

От абортированных плодов и животных с поражением нервной системы головного и спинного мозга брали ткани плаценты, легких, печени, селезенки, надпочечников и тимуса.

Наличие телец включения эозинофильных ядер в бронхиолярном эпителии или клетки вокруг некротической области печени были инфицированы с диагнозом вируса герпеса. Характерной микроскопической патологией, связанной с невропатией ВГЛ-1, является дегенеративный тромбангиит головного или спинного мозга (периваскулярная манжета и инфильтрация воспалительных клеток, пролиферация и некроз эндотелиальных клеток, а также тромбоз).



# Серологические тесты

## Серология

Положительный диагноз основан на значительном увеличении титра антител в сыворотке (в четыре раза или выше) в острой фазе и фазе выздоровления)

Тест на нейтрализацию микро сыворотки

Энзим связанный иммуносорбентный метод исследования ИФА (ELISA)

Реакция связывания компонента РСК

# Сравнение серологических методов



# Тест на нейтрализацию микро сыворотки

Требования к реагентам и расходным материалам:

1. Стандартные штаммы вируса с известным титром
2. Е-дерма или клетка
3. Лошадиная сыворотка с положительным и отрицательным контролем антител
4. 96-луночный микротитровальный планшет с плоским дном (класс культуры ткани)

# Тест на нейтрализацию микро сыворотки

Требования к испытательной среде и оборудованию:

1. Лаборатория уровня биобезопасности 2 и выше
2. Инкубатор CO<sub>2</sub>
3. Шкаф биологической безопасности



Профессиональный и технический персонал должен быть обучен соответствующим стандартам и стандартным операционным процедурам лаборатории, сдать экзамен и получить разрешение; они должны обладать крепкими техническими навыками, уметь правильно использовать реактивы в соответствии со стандартами и инструкциями к реактивам, правилами обработки химических веществ и отходов в числовой лаборатории, соответствующими правилами биобезопасности, правилами ликвидации аварийных ситуаций в лаборатории, правилами конфиденциальности результатов и процедурами сообщения о положительных результатах и т.д.

Персонал, входящий в рабочую зону лаборатории, должен использовать средства индивидуальной защиты. Самые основные средства защиты включают лабораторную одежду с длинными рукавами, одноразовые перчатки, одноразовые медицинские маски и т.д.; Соответствующие средства индивидуальной защиты должны быть выбраны в соответствии с отчетом об оценке риска биологических факторов.

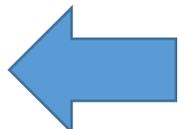


# Этапы тестирования

- i) Тестируемую сыворотку и контрольную сыворотку инактивировать на водяной бане при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут.



<b>A</b>	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>	<b>S9</b>	<b>S10</b>		
<b>B</b>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
<b>C</b>	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2		
<b>D</b>	1: 4	1: 4	1: 4	1: 4	1: 4	1: 4	1: 4	1: 4	1: 4	1: 4		
<b>E</b>	1: 8	1: 8	1: 8	1: 8	1: 8	1: 8	1: 8	1: 8	1: 8	1: 8		
<b>F</b>	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16	1: 16		
<b>G</b>	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32	1: 32		
<b>H</b>	1: 64	1: 64	1: 64	1: 64	1: 64	1: 64	1: 64	1: 64	1: 64	1: 64		



контроль  
ТОКСИЧНОСТИ  
СЫВОРОТКИ

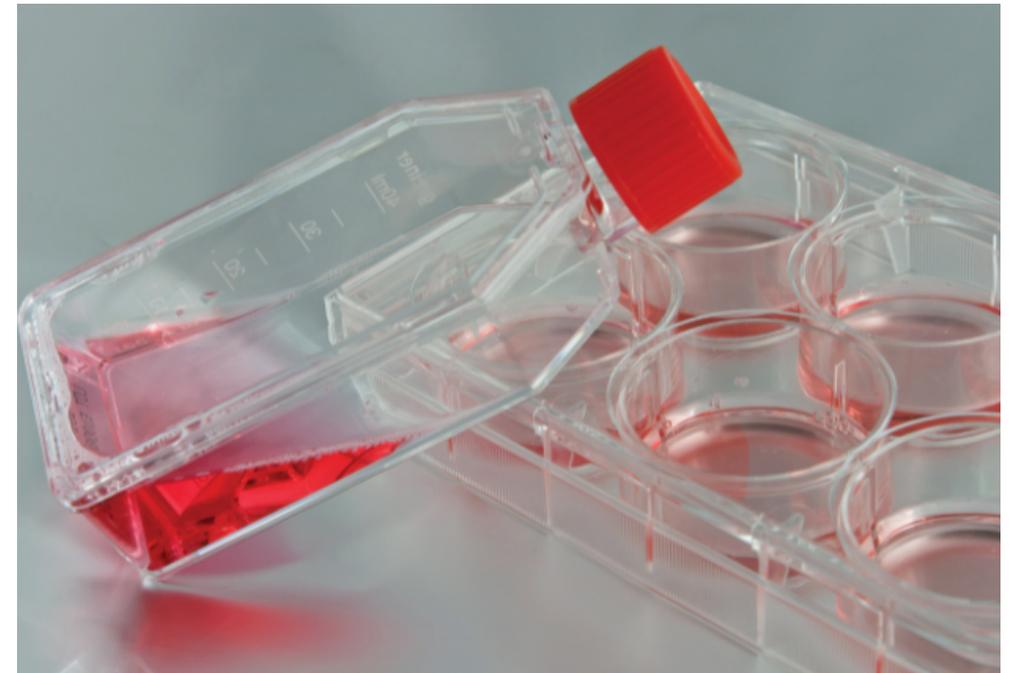
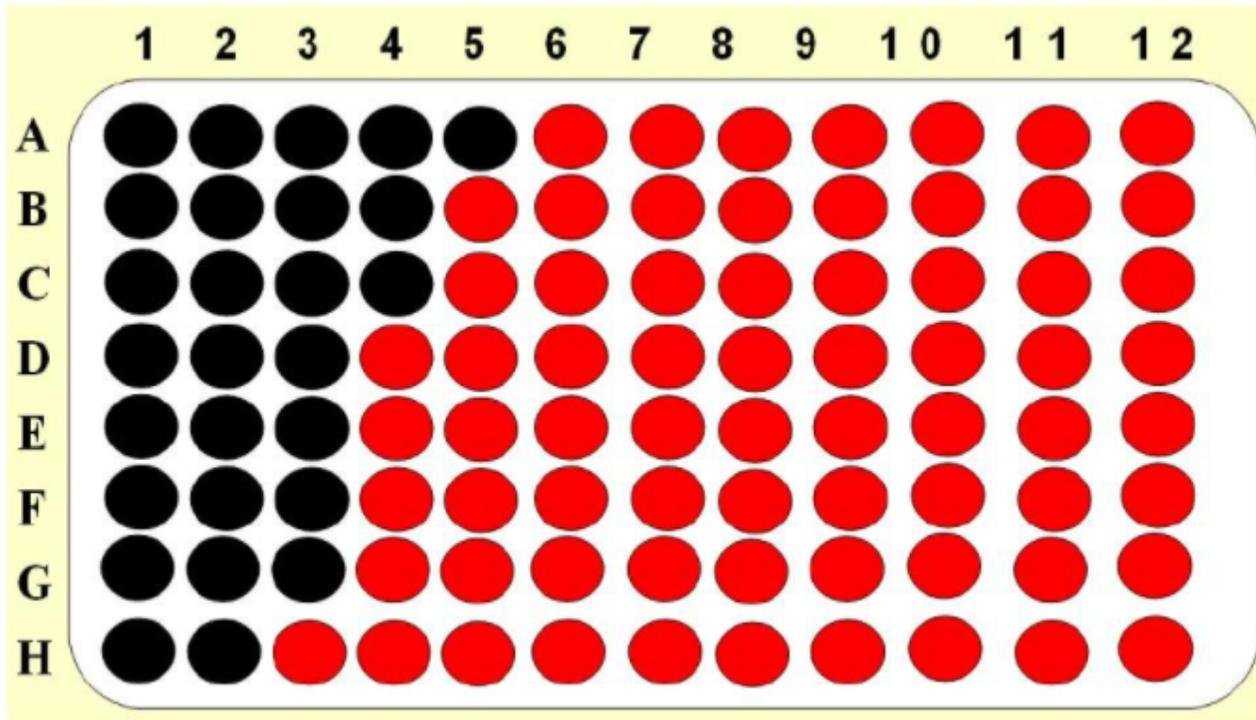


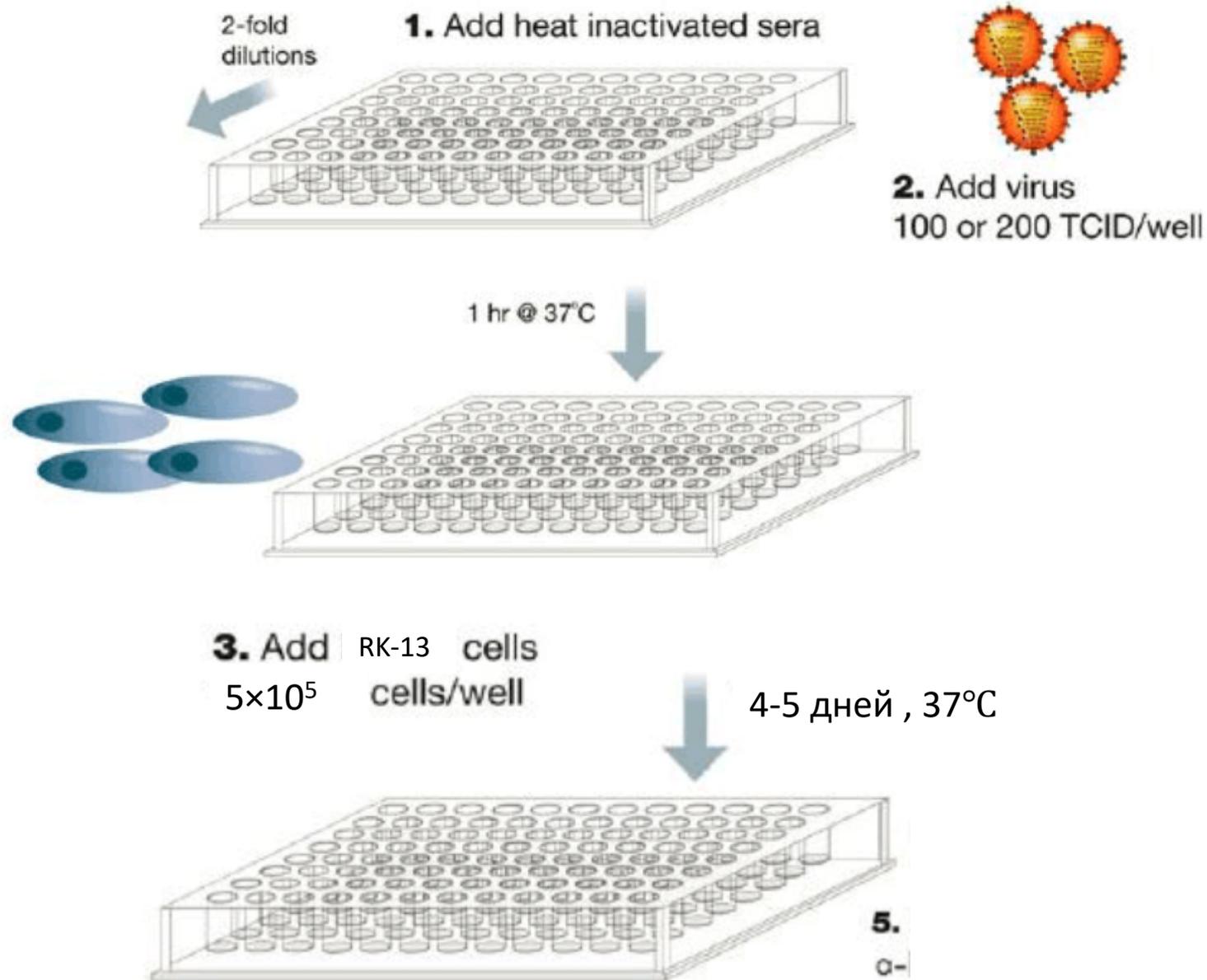
Многократное разведение

II) добавьте 25 мкл MEM во все лунки микропланшета.

III) пипеткой нанесите 25 мкл испытуемой сыворотки в строки а и В микропланшета. Строка а использовалась в качестве контроля токсичности сыворотки, а строка В - в качестве теста на токсичность сыворотки при первом разведении. Градиентное разведение от строки В до последней строки

iv) Добавить 25 мкл разбавленного соответствующим образом исходного раствора вируса ВГЛ-1 или ВГЛ-4 (100 TCID<sub>50</sub> / лунку) в каждую лунку. А исключается, а А используется для мониторинга сывороточной токсичности индикаторных клеток в лунке контрольной сыворотки.





v) Использовать отдельный контрольный планшет, включающий титрованную отрицательную и положительную лошадиную сыворотку с известными титрами, клеточный контроль (без вируса), вирусный контроль (без сыворотки) и титрование вирусов для расчета фактического количества вирусов, использованных в тесте.

vi) Инкубировать чашку в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 1 часа.

vii) Добавить 50 мкл суспензии клеток E-Derm или RK-13 (5 × 10<sup>5</sup> клеток/мл) в каждую лунку.

viii) Инкубировать в течение 4-5 дней при 37°C и 5% углекислого газа в воздухе.

ix) Проверить состояние СРЕ каждого отверстия с помощью микроскопа и записать результат в рабочую таблицу.

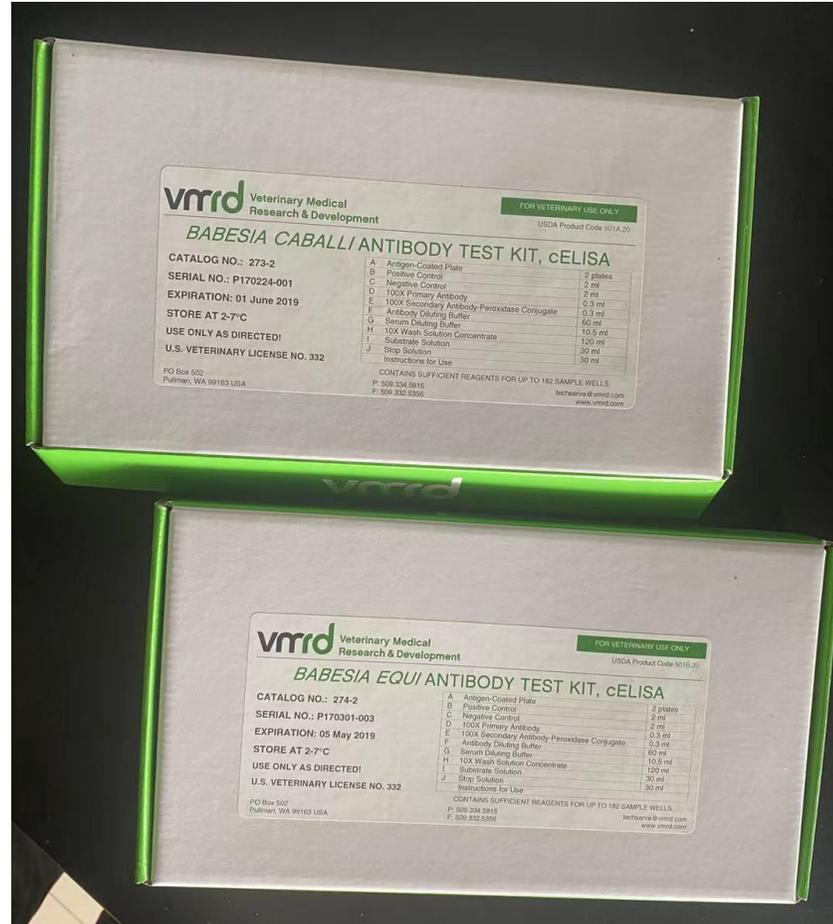
xi) Рассчитать титр нейтрализации каждой исследуемой сыворотки и сравнить увеличение титра сыворотки в остром периоде и периоде выздоровления.

## **Определение**

5.3.2 or vaccinated equidae: two serum neutralization tests of paired samples at 14 days interval, with the negative result of second blood serum with no less than 4-fold increase in titre.

# IΦA 检测

The picture can't be displayed.



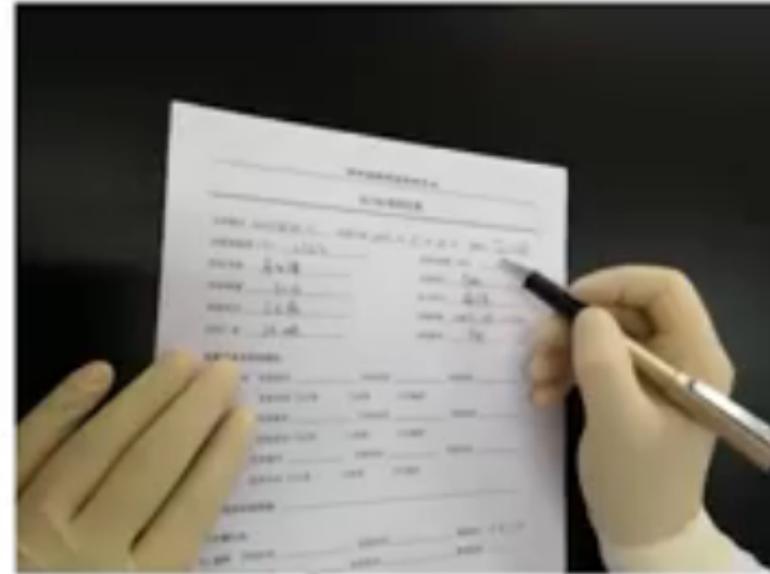
## Требования к персоналу

Профессиональный и технический персонал должен быть обучен соответствующим стандартам и стандартным операционным процедурам лаборатории, сдать экзамен и получить разрешение; они должны обладать крепкими техническими навыками, уметь правильно использовать реактивы в соответствии со стандартами и инструкциями к реактивам, правилами обработки химических веществ и отходов в числовой лаборатории, соответствующими правилами биобезопасности, правилами ликвидации аварийных ситуаций в лаборатории, правилами конфиденциальности результатов и процедурами сообщения о положительных результатах и т.д.

Персонал, входящий в рабочую зону лаборатории, должен использовать средства индивидуальной защиты. Самые основные средства защиты включают экспериментальную одежду с длинными рукавами, одноразовые перчатки, одноразовые медицинские маски и т.д.; Соответствующие средства индивидуальной защиты должны быть выбраны в соответствии с отчетом об оценке риска биологических факторов.



Температура и влажность окружающей среды должны контролироваться в соответствии с требованиями испытательного оборудования и конкретного теста ИФА, и должны быть сделаны соответствующие записи.



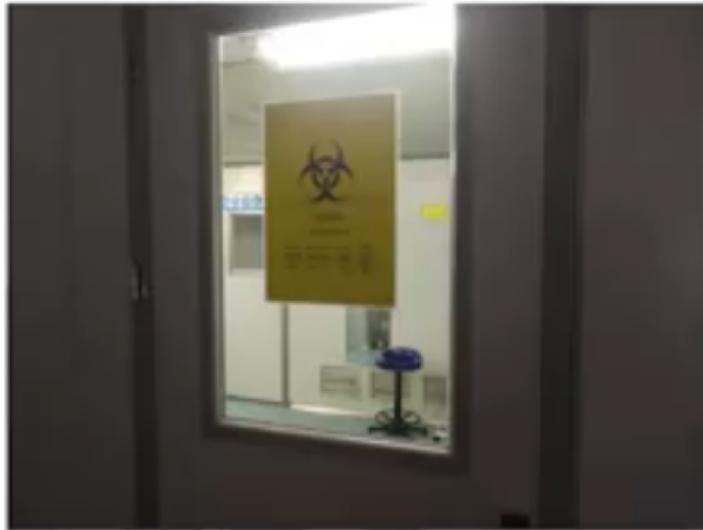
При необходимости лаборатория может быть оснащена источником бесперебойного питания (ИБП) или двойным источником питания для обеспечения нормальной работы ключевого оборудования (такого как мойка пластин, прибор для маркировки ферментов, инкубатор, холодильник и т.д.).



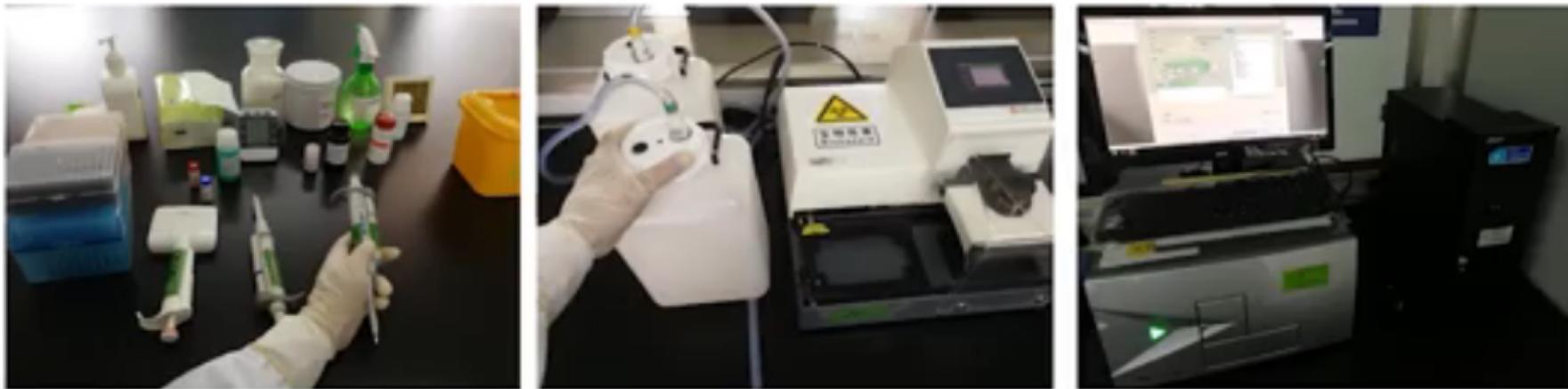
Лаборатория должна быть оснащена необходимыми средствами защиты, такими как промыватель глаз для экстренной помощи, аварийное оборудование и т.д.



Идентификация лаборатории является четкой и стандартизированной



Убедитесь, что характеристики и параметры прибора для маркировки ферментов, мойки пластин, пипеток и другого оборудования соответствуют требованиям испытаний; ключевое оборудование должно иметь правильную идентификацию статуса оборудования в течение срока действия калибровки.



Шкаф биологической безопасности и паровой стерилизатор высокого давления должны регулярно проверяться.

Для основного оборудования должны проводиться периодическая проверка, мониторинг производительности и регулярное техническое обслуживание.

Перед каждым испытанием оборудование должно быть запущено для проверки, и испытание может быть проведено только после подтверждения его нормального состояния.



**Загрузка**

**Инкубация**

**Мойка**

**Конъюгировать**



**Добавьте субстрат  
(темное место)**

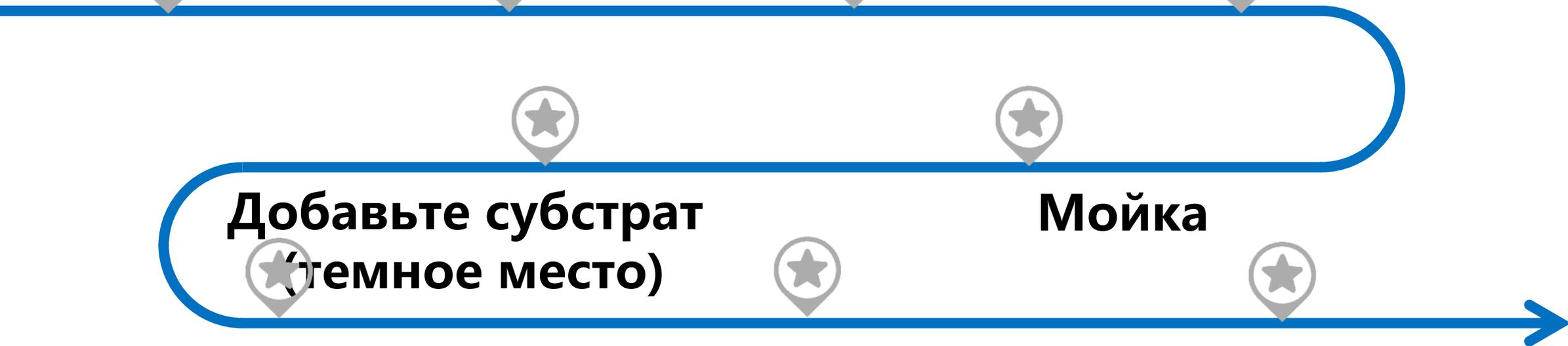
**Мойка**



**Остановить**

**Считывание**

**Результат**



Ключевые моменты:Прочтите стандарты или СОП и внимательно подготовьте исходные записи.

版权所有 · 禁止翻制、电子发售

**SN**

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1142—2011  
代替 SN/T 1142—2002, SN/T 1377—2004

---

马病毒性动脉炎检疫技术规范

Quarantine protocol for equine viral arteritis

2011-05-31 发布 2011-12-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

CHAPTER 3.6.10.

**EQUINE VIRAL ARTERITIS (INFECTION WITH EQUINE ARTERITIS VIRUS)**

---

**SUMMARY**

*Equine viral arteritis (EVA) is a contagious viral disease of equids caused by equine arteritis virus (EAV), an RNA virus classified in the genus, Arterivirus, family Arteriviridae. Equine arteritis virus is found in horse populations in many countries world-wide. Although infrequently reported in the past, confirmed outbreaks of EVA appear to be on the increase.*

**Description of the disease:** *The majority of naturally acquired infections with EAV are subclinical. Where present, clinical signs of EVA can vary in range and severity. The disease is characterised principally by fever, depression, anorexia, dependent oedema, especially of the limbs, scrotum and prepuce in the stallion, conjunctivitis, an urticarial-type skin reaction, abortion and, rarely, a fulminating pneumonia, enteritis or pneumo-enteritis in young foals. Apart from mortality in young foals, the case-fatality rate in outbreaks of EVA is very low. Affected horses almost invariably make complete clinical recoveries. A long-term carrier state can occur in a variable percentage of infected stallions, but not in mares, geldings or sexually immature colts.*

**Identification of the agent:** *EVA cannot be differentiated clinically from a number of other respiratory and systemic equine diseases. Diagnosis of EAV infection is laboratory dependent and based on virus isolation, detection of nucleic acid or viral antigen, or demonstration of a specific antibody response. Detection and identification of EAV nucleic acid in suspect cases of the disease can be attempted using various reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays. The identity of isolates of EAV should be confirmed by RT-PCR assay, neutralisation test, or by immunocytochemical methods, namely indirect immunofluorescence or avidin-biotin-peroxidase techniques.*

*Where mortality is associated with a suspected outbreak of EVA, a wide range of tissues should be examined for histological evidence of panvasculitis that is especially pronounced in the small arteries throughout the body. The characteristic vascular lesions present in the mature animal are not a notable feature in EVA-related abortions, diagnosis of which is based on virus isolation, viral nucleic acid detection by RT-PCR or demonstration of EAV antigens by immunohistochemical examination of placental and various fetal tissues.*

**Serological tests:** *A variety of serological tests, including virus neutralisation (VN), complement fixation (CF), indirect fluorescent antibody, agar gel immunodiffusion, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the fluorescent microsphere immunoassay (MIA) have been used for the detection of antibody to EAV. The tests currently in widest use are the complement-enhanced VN test and the ELISA. The VN test is a very sensitive and highly specific assay of proven value in diagnosing acute infection and in seroprevalence studies. Several ELISAs have been developed. Although none have been as extensively validated as the VN test, some offer comparable specificity and close to equivalent sensitivity. The CF test is less sensitive than either VN test or ELISA, but it can be used for diagnosing recent infection.*

**Requirements for vaccines:** *Two commercial tissue culture derived vaccines are currently available against EVA. One is a modified live virus (MLV) vaccine prepared from virus that has been attenuated for horses by multiple serial transfers in primary equine and rabbit kidney cells and in an equine dermal cell line. It has been confirmed to be safe and protective for stallions and nonpregnant mares. Vaccination of foals less than 6 weeks of age and of pregnant mares in the final 2 months of gestation is not recommended. There is no evidence of back reversion of the vaccine virus to virulence or of recombination with naturally occurring strains of EAV following its*

---

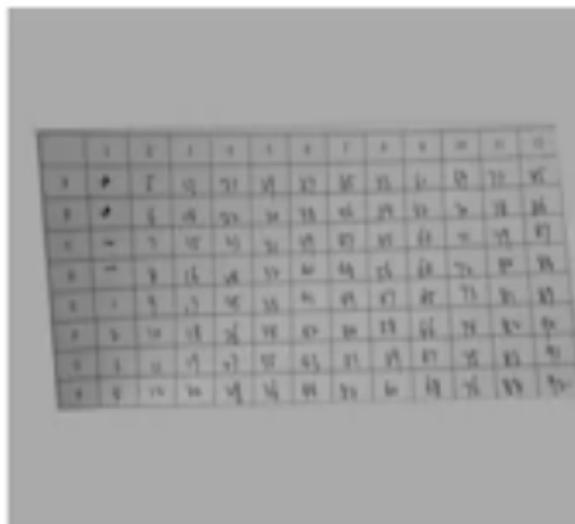
OIE Terrestrial Manual 2018 1333

Подготовка пробы: Во время приемки пробы проверьте, соответствуют ли статус пробы, название, номер, количество пробы и упаковка требованиям, и сделайте соответствующие записи. Существует много типов тестовых образцов ИФА, наиболее часто используемыми являются сыворотки.

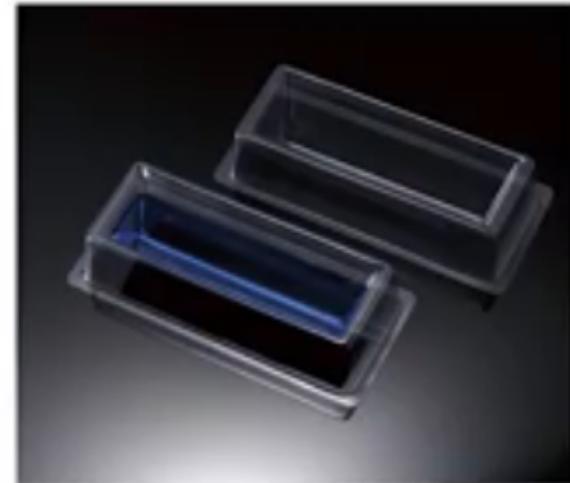
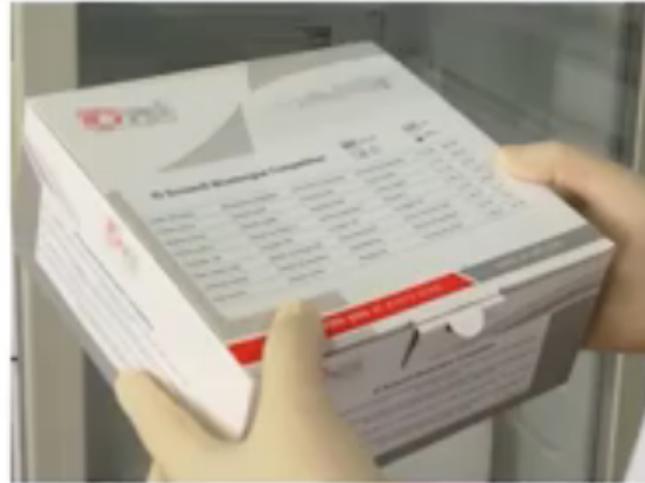


## Ключевые точки обнаружения

№: пронумеруйте планшет с образцом для тестирования и планшет с этикеткой фермента соответственно; Отметьте положительный и отрицательный контроль и по одному зарегистрируйте образцы для тестирования в микропорах.



Подготовка расходных материалов для реагентов: подготовьте достаточное количество расходных материалов для реагентов в соответствии с количеством образца, тщательно проверьте упаковку реагентов, срок годности, состав реагентов и другую информацию



Приготовление раствора: лосьон, фермент и туберкулин в наборе должны быть приготовлены в строгом соответствии с инструкцией к реагенту, и должны быть использованы и приготовлены как

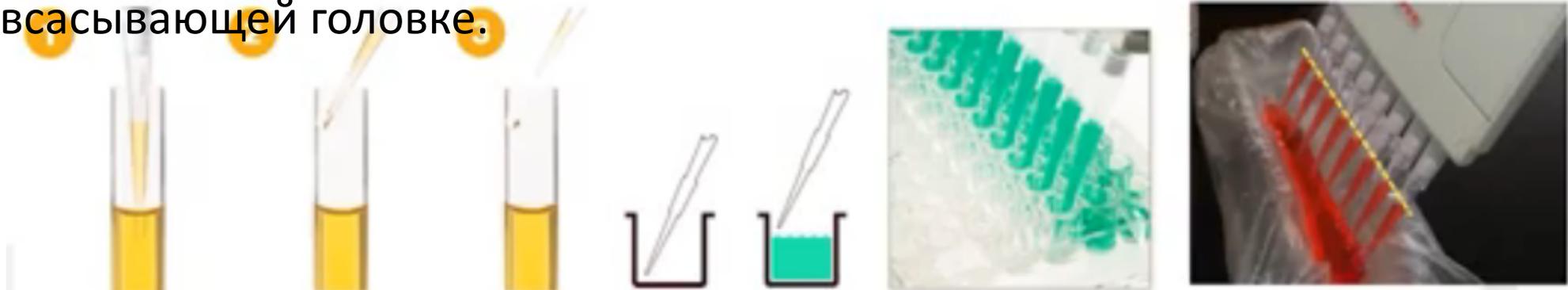
МОЖ



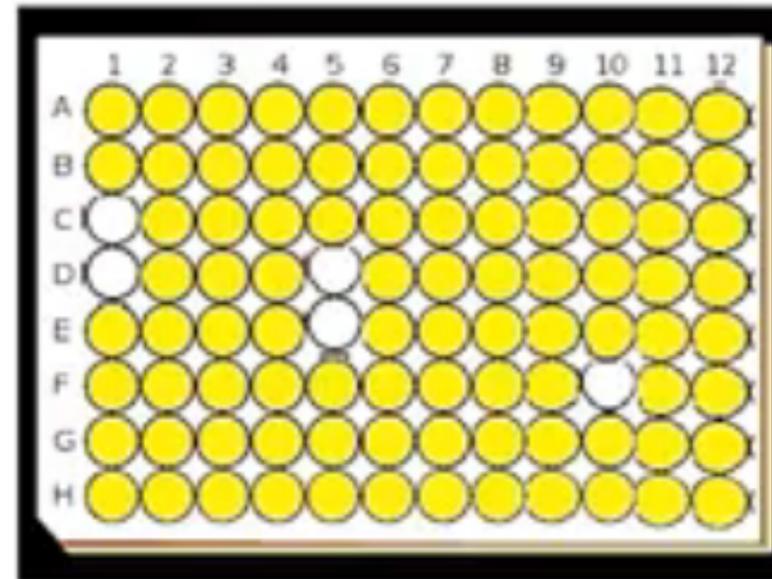
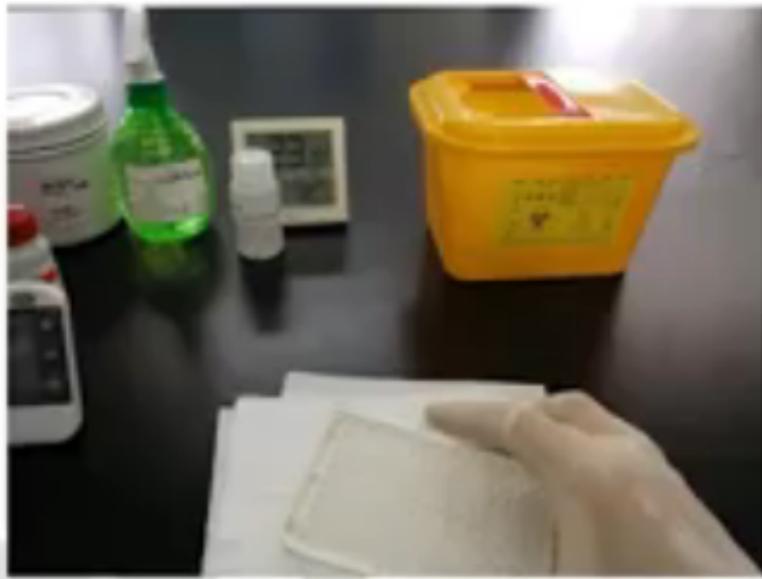
Добавление жидкости: при добавлении образцов, инъ-ян контроля, ферментных конъюгатов, раствора субстрата и конечного раствора, убедитесь, что количество добавляемой жидкости точно, и хорошо перемешивайте после каждого добавления жидкости, чтобы избежать загрязнения.



Точная техника переноса жидкости: после всасывания используйте всасывающую головку для контакта с боковой стороной "контейнера", чтобы удалить лишнюю жидкость за пределы всасывающей головки. При использовании пипетки, если микропланшет пуст, пожалуйста, протяните всасывающую головку к нижнему углу каждого отверстия (не касаясь дна); если в микропланшете есть жидкость, пожалуйста, поместите кончик всасывающей головки над жидкостью. Попробуйте всосать жидкость 1 ~ 2 раза и проследите за уровнем жидкости во всасывающей головке.



Мойка: мойте в строгом соответствии с количеством раз мытья набора и количеством моющего средства в наборе. Следует избегать перекрестного загрязнения. Развитие цвета: избегать света, точно определять время и вовремя останавливать реакцию.



Инкубация: необходимо подтвердить температуру инкубации и время инкубации, а также точно рассчитать их время

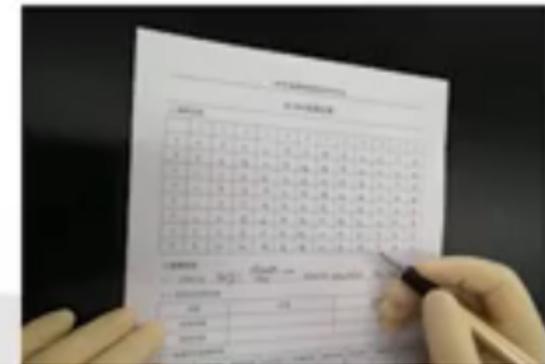


Считывание: настройка программы считывания микропланшетов соответствует требованиям набора. Сначала проследите за цветом микропланшета невооруженным глазом, убедитесь в точности показаний и правильно сохраните исходные данные.



Ключевые моменты обнаружения. Расчет результатов: когда были установлены отрицательные и положительные результаты контроля, расчет был точным; Если отрицательные и положительные результаты контроля аномальны, необходимо выяснить причину и перепроверить Результат

Определение: определение должно проводиться в строгом соответствии с соответствующими стандартами или инструкциями к набору. Положительные образцы и подозрительные образцы должны быть повторно протестированы для подтверждения



Обработка отходов: после стерилизации под высоким давлением сдайте его в компанию по переработке медицинских отходов и сделайте соответствующие записи.



Очистка и дезинфекция: после эксперимента лабораторная среда, помещения и оборудование должны быть тщательно продезинфицированы, ультрафиолетовая лампа должна быть включена для дезинфекции более чем на 30 минут, и должны быть сделаны соответствующие записи.



■ Спасибо