

ГЛАВА 3.1.2 БОЛЕЗНЬ АУЕСКИ (ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ БОЛЕЗНИ АУЭСКИ)

РЕЗЮМЕ

Возбудителем болезни Ауески, также известной под названием псевдобешенство, является альфагерпесвирус, который инфицирует центральную нервную систему и другие органы, такие как дыхательные пути, практически у всех млекопитающих, кроме людей и бесхвостых обезьян. Главным образом он ассоциирован со свиньями, его естественным хозяином, которые после выздоровления от клинической формы болезни остаются латентно инфицированными (за исключением поросят в возрасте младше двух недель, которые погибают от энцефалита). Контроль за болезнью осуществляется посредством локализации инфицированных стад, применения вакцин и/или удаления латентно инфицированных животных.

Диагностика болезни Ауески осуществляется посредством обнаружения возбудителя (выделение вируса, полимеразная цепная реакция (ПЦР)), а также выявления серологической реакции у живых животных.

Идентификация агента. *Выделение вируса болезни Ауески можно производить посредством инокуляции тканевого гомогената, например головной мозг и миндалин или материал, собранный из носа/глотки, в чувствительную линию клеток, такую как свиная почка (PK-15) или SK6, или первичные или вторичные клетки почки. Специфичность цитопатогенного действия подтверждают с помощью иммуофлуоресценции, иммунопероксидазного метода или реакции нейтрализации с использованием специфической антисыворотки. Идентификацию вирусной ДНК можно произвести с помощью ПЦР, это можно произвести методами ПЦР в реальном времени.*

Серологические тесты. *Обнаружение антител к вирусу болезни Ауески производят посредством реакции нейтрализации, латекс агглютинации или иммуноферментного анализа (ИФА). По всему миру в продаже есть ряд ИФА-наборов. Для рутинного тестирования в лабораториях, осуществляющих серологическую диагностику болезни Ауески, нижний предел чувствительности определяет международная стандартная сыворотка МЭБ.*

С началом использования вакцин с deletированным геном появилась возможность дифференцировать антитела, вырабатываемые вследствие естественного заражения и вследствие вакцинации.

Требования к вакцинам. *Вакцины должны предотвращать или, как минимум, ограничивать экскрецию вируса из инфицированных свиней. В рекомбинантных вакцинах, полученных из ДНК с deletированным геном, или в вакцинах на основе живого вируса Ауески, deletированного естественным образом, отсутствует специфический гликопротеин (gG, gE или gC), что позволяет использование сопутствующих диагностических тестов для проведения дифференциации между вакцинными антителами и антителами, образующимися в результате естественной инфекции.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем болезни Ауески, также известной под названием псевдобешенство, является *Suid herpesvirus 1* (SHV-1), член подсемейства *Alphaherpesvirinae* и семейства *Herpesviridae*. С вирусом в основном работают в лабораториях класса BSL-2. Вирус инфицирует центральную нервную систему и другие органы, такие как дыхательные пути, фактически у всех млекопитающих (таких как собак, кошек, КРС, овец, кроликов, лис, норок и т.д.), кроме человека и бесхвостых обезьян. Главным образом он ассоциирован со свиньями, его естественным хозяином, которые после выздоровления от клинической формы болезни остаются латентно инфицированными (за исключением поросят в возрасте младше двух недель, которые погибают от энцефалита). Как следствие свинья является единственным видом, способным выживать при продуктивной инфекции и, поэтому, служит хозяином-резервуаром. У свиней тяжесть клинических признаков зависит от возраста свиньи, пути инфицирования и вирулентности инфицирующего штамма и иммунологического статуса животных. Молодые поросята очень восприимчивы, у них уровень смертности достигает 100% в течение первых двух недель. У этих животных наблюдается повышенная температура и тяжелые неврологические нарушения: тремор, расстройство координации, атаксия, нистагм до опистотонуса и тяжелые припадки, схожие с судорогами при эпилепсии. Если поросята старше двух месяцев (свиньи на доращивании и откорме), преобладают респираторные формы с повышением температуры, потерей аппетита, слабовыраженными до тяжелых респираторными признаками: ринит с чиханием и выделениями из носа, которые могут прогрессировать до развития пневмонии. Частота вторичных бактериальных инфекций высока, в зависимости от статуса здоровья инфицированного стада. В такой группе свиней заболеваемость может достигать 100%, но в случаях, когда осложненные вторичные инфекции отсутствуют, смертность варьирует в пределах 1-2% (Pejsak & Truszczyński, 2006). У свиноматок и хряков обычно наблюдается появление респираторных признаков, а у супоросных свиноматок вирус может преодолевать плаценту, инфицировать и убивать плод, вызывая аборт, повторение эструса и мертворождение. У других восприимчивых видов животных болезнь смертельна, преобладающим признаком является сильный зуд, приводящий к тому, что животное разгрызает или расчесывает часть тела, обычно голову или задние конечности, пока не развивается серьезное разрушение ткани. По этой причине эту болезнь в прошлом называли бешеный зуд.

Очаговые некротические поражения и поражения в виде энцефаломиелита возникают в головном мозге, мозжечке, надпочечниках и других внутренних органах, таких как легкие, печень или селезенка. У эмбрионов или очень молодых поросят патогномичными признаками инфекции этим вирусом являются белые пятна на печени. Внутрядерные поражения часто обнаруживают в нескольких тканях.

Болезнь Ауески является эндемичной во многих частях мира, но несколько стран провели успешную программу искоренения, например, Соединенные Штаты Америки, Канада, Новая Зеландия и многие страны-члены Европейского Союза.

Контроль болезни осуществляют посредством локализации инфицированных стад и использования вакцин и/или удаления латентно инфицированных животных (Pejsak & Truszczyński, 2006). Полный санитарный убой обычно использовался и используется в нескольких странах, если инфицированные фермы небольшого размера или если угроза для окружающих ферм слишком высока в свободных странах.

Тогда как выделение вируса болезни Ауески или выявление вирусного генома с помощью полимеразной цепной реакции используются для диагностики в случае летальных форм

болезни Ауески или клинического заболевания у свиней, серологические тесты требуются для диагностики латентных инфекций и после исчезновения клинических признаков. Пораженные животные, за исключением свиней, не живут достаточно долго, чтобы продуцировать какой-либо отчетливый серологический ответ. Серологические тесты являются методом, используемым для выявления субклинически или латентно инфицированных свиней, особенно в случае определения статуса здоровья животных для международной торговли или в других целях.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация агента

а) Выделение вируса

Подтверждение диагноза, болезнь Ауески, можно произвести посредством выделения вируса из ротоглоточной жидкости, назальной жидкости (мазки) или мазков миндалин от живых свиней или из образцов, полученных от павших свиней или от свиней после появления клинических признаков, таких как энцефалит у травоядных или плотоядных. Для посмертного выделения SHV-1 предпочтительными образцами являются образцы головного мозга, миндалин или легких. У КРС инфекция обычно характеризуется зудом, в таком случае для выделения вируса может понадобиться образец соответствующего отдела спинного мозга. У латентно инфицированных свиней наиболее сообразным участком для выделения вируса является ганглий тройничного нерва, хотя обычно латентный вирус обычно является неинфекционным, пока он не реактивирован, что затрудняет его выделение в культуре.

Образцы гомогенизируют в нормальном физиологическом растворе или среде для культивирования клеток с добавлением антибиотиков, полученную суспензию осветляют посредством центрифугирования на низкой скорости при 900 g в течение 10 минут. Надосадочную жидкость используют для инокуляции любой чувствительной системы культуры клеток. К SHV-1 чувствительны многочисленные линии клеток или первичные клеточные культуры, но обычно используется линия клеток почки свиньи (PK-15). Покрывающая среда для культур должна содержать антибиотики (такие как: 200 МЕ/мл пенициллина; 100 мкг/мл стрептомицина; 100 мкг/мл полимиксина и 3 мкг/мл фунгизона).

SHV-1 индуцирует цитопатогенное действие (ЦПД), которое проявляется в течение 24-72 часов, но культуры клеток можно инкубировать и в течение 5-6 дней. В монослое наблюдается образование скоплений двоякопреломляющих клеток с последующим полным отделением клеточного слоя. Также происходит образование синцитий различного внешнего вида и размера. При отсутствии любого видимого ЦПД рекомендуется провести один слепой пассаж на дополнительных культурах. Дополнительные подтверждения можно получить посредством окрашивания инфицированных культур на покровных стеклах гематоксилином и эозином с целью демонстрации характерных для герпесвируса ацидофильных внутриядерных включений, окаймленных хроматином. Идентичность вируса должна быть подтверждена посредством иммунофлуоресценции, иммунопероксидазного метода или реакции нейтрализации с применением специфической антисыворотки.

Выделение SHV-1 позволяет подтвердить наличие болезни Ауески, однако неудача при выделении не гарантирует свободы от инфекции.

в) Идентификация вируса посредством полимеразной цепной реакции

Для идентификации геномов SHV-1 в секретах или образцах органов можно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Многие отдельные лаборатории разработали эффективные протоколы, но международно-признанного стандартизированного подхода еще не существует.

В основе ПЦР лежит избирательная амплификация специфической части генома с использованием двух праймеров, расположенных на каждом конце избранной последовательности. На первом этапе выделение полной ДНК можно произвести с помощью стандартных процедур (например, расщепление с помощью протеиназы К, экстрагирование с помощью фенол-хлороформа) или с помощью коммерческих наборов для экстрагирования ДНК. Используя циклы денатурации ДНК для получения матриц в виде одноцепочечной ДНК, гибридизацию праймеров и синтез комплементарных последовательностей с применением термостабильной ДНК-полимеразы, целевую последовательность можно амплифицировать до 10^6 раз. Праймеры должны быть созданы таким образом, чтобы амплифицировать последовательность, которая является консервативной среди штаммов SHV-1, например, были использованы части gB- и gD-генов, которые кодируют главные гликопротеины (Mengeling *et al.*, 1992, Van Rijn *et al.*, 2004, Yoon *et al.*, 2006). Разработана ПЦР в реальном времени, которая способна дифференцировать gE-делетированные вакцинные вирусы от вирусов дикого типа посредством специфического обнаружения gB и gE генов (Ma *et al.*, 2008). Однако gE-специфичная ПЦР в реальном времени имеет более низкую чувствительность, чем gB-специфичная ПЦР в реальном времени.

Идентификацию амплифицированного продукта можно произвести по его молекулярному весу, который устанавливается при миграции в агарозном геле, с дальнейшим подтверждением, там, где возможно, посредством гибридизации с использованием саузерн-блоттинга с применением комплементарного зонда. В современных методах используется жидкостная гибридизация с мечеными ферментом зондами, при которой после инкубации с соответствующим субстратом происходит цветная реакция. Более новые методы включают использование флуоресцентных зондов, связанных с действием экзонуклеазы и мониторинг в реальном времени за эволюцией продукта, что позволяет проводить одновременно амплификацию и подтверждение матричной ДНК, тем самым повышая скорость и специфичность анализов ПЦР.

Во всех случаях главным преимуществом ПЦР по сравнению с традиционными методами выделения вируса является его быстрота: при использовании современного оборудования можно произвести весь процесс идентификации и подтверждения в течение одного дня. Однако, учитывая природу теста, следует соблюдать многие меры предосторожности, чтобы избежать контаминации образцов чужеродными ДНК из предыдущих тестов или вследствие общей контаминации окружающей среды в лаборатории (смотри Главу I.1.9. *Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*). Это может ограничивать ценность теста для многих лабораторий, если не соблюдается осторожность в целях недопущения контаминации переносом ДНК. Использование внутреннего контроля необходимо для избежания ложноотрицательных результатов, посредством обеспечения надлежащей эффективности экстрагирования ДНК и подтверждения отсутствия ингибиторов ПЦР в каждой пробе. На практике, для выявления эндогенного или экзогенного гена можно применять различные системы (Hoffman *et al.*, 2009).

2. Серологические тесты

Реакция нейтрализации вируса считается эталонным методом для серологии (Moennig *et al.*, 1982), но для общих диагностических целей, её повсеместно заменяют иммуноферментным анализом (ИФА), т.к. данный тест пригоден для широкомасштабного тестирования (Moennig *et al.*, 1982). Эти тесты можно проводить на различных матрицах (напр. сыворотке крови, цельной крови, мышечных экссудатах и фильтровальной бумаге), но предпочтительной матрицей является сыворотка крови.

Также разработана реакция латекс-агглютинации, данную реакцию можно использовать для массового обследования на наличие антител. Она позволяет дифференцировать иммунный ответ естественно инфицированных свиней и иммунный ответ свиней, которые подвергались вакцинации gE-делетированными вакцинами (Yong *et al.*, 2005). В продаже есть наборы для проведения данного теста (Schoenbaum *et al.*, 1990).

Серологические тесты проводятся только для свиней, так как другие животные (травоядные и плотоядные) умирают слишком быстро, и антитела не успевают вырабатываться. В свободных зонах, где свиньи не вакцинируются, можно проводить активный эпидемиологический надзор с использованием ИФА gB наборов. Так как антитела можно выявлять с 7 по 10 день после инфекции этот серологический метод можно также использовать в случае подозрения на вспышку для подтверждения наличия инфекции у свиней. В зоне, где свиней вакцинируют gE-делетированными вакцинами, наборы ИФА gE позволяют проводить дифференциацию между инфицированными и вакцинированными свиньями (стратегия DIVA), но для оценки напряженности иммунитета, индуцированного вакцинацией, следует использовать наборы ИФА gB или реакцию вирус нейтрализации.

Любой используемый серологический метод должен быть достаточно чувствительным, чтобы давать положительный результат при применении международной стандартной эталонной сыворотки МЭБ. Данную сыворотку можно получить из Справочной лаборатории МЭБ по болезни Ауески во Франции (см. таблицу в Части 4 данного Руководства по наземным животным). Для международной торговли, тест должен быть настолько чувствительным, чтобы обнаруживать стандартную сыворотку, разведенную 1/2. Для разрешения перемещения свиней из зоны, где используются gE-делетированные вакцины, в свободную зону, серологические анализы должны быть способны выявлять, как минимум, разведение 1/8 для ИФА gE стандартной справочной сыворотки МЭБ, как это предписано Европейской Комиссией (2008 г.).

a) Реакция нейтрализации вируса (предписанный тест для международной торговли)

Нейтрализацию вируса в культуре клеток можно произвести несколькими путями, которые отличаются по продолжительности периода инкубации смесей вирус/сыворотка крови (например, 1 час при 37°C или 24 часа при 4°C) и по присутствию или отсутствию комплемента. В большинстве лабораторий используется реакционный период продолжительностью 1 час при 37°C при отсутствии комплемента, поскольку это легко и быстро. Однако чувствительность метода можно повысить, увеличив период инкубации до 24 часов при 4°C, что делает возможным обнаружение уровней антител в 10-15 раз ниже, чем при использовании первого метода, когда инкубация производится в течение одного часа. Для международной торговли данный тест-метод следует валидировать, как метод, обладающий

чувствительностью, достаточной для обнаружения стандартной справочной сыворотки МЭБ, разведенной $\frac{1}{2}$.

Реакцию нейтрализации вируса нельзя использовать для дифференциации антител, индуцированных вакциной, и антител, индуцированных вследствие естественного заражения. Данный тест является одним из двух имеющихся тестов, соответствующих требованию, изложенному в главе *Ветеринарно-санитарного кодекса МЭБ по наземным животным*, когда его упоминают как «диагностический тест для цельного вируса».

i) Клетки

Используются клетки, чувствительные к заражению SHV-1; это могут быть клеточные линии (например, РК-15, SK6, MDBK) или первичные или вторичные культуры клеток.

ii) Среда для культивирования клеток

Выбор среды зависит от типа клеток. Например, средой для РК-15 клеток является минимальная поддерживающая среда Игла (MEM) + 10% фетальная телячья сыворотка и антибиотики (100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина или, альтернативно, 50 мкг/мл гентамицина).

iii) Поддержание клеток

Клетки культивируют в сосудах для культивирования клеток объемом, например, 75 см². Один или два раза в неделю производят их трипсинизацию. Для трипсинизации один раз в неделю клетки обычно культивируют в 50 мл среды при скорости размножения равной 5. Для трипсинизации два раза в неделю клетки культивируют в 30 мл среды со скоростью размножения равной 3.

Для трипсинизации сразу же по завершении формирования пласта клеток ростовую среду удаляют. Пласт клеток промывают примерно 5 мл недавно оттаявшей трипсин/этилен-диамин тетрауксусной кислоты (ЭДТК) (0,25%) в изотоническом буфере. Жидкость для промывания удаляют, препарат промывают опять, сохраняя лишь несколько капель трипсина. Контейнер помещают в инкубатор при 37°C на 5-10 минут до тех пор, пока клетки не начнут отделяться. Сразу же после отделения слоя и явного разделения клеток для пассирования один раз в две недели производят их суспендирование в 90 мл ростовой среды и эту суспензию распределяют по трем флаконам для культивирования клеток объемом 75 см². Если трипсинизацию осуществляют раз в неделю, то клетки суспендируют в 150 мл ростовой среды, а суспензию распределяют по пяти 75 см² флаконам для культивирования клеток.

iv) Вирус

Подходящий штамм SHV-1, такой как штамм Kojnok или штамм NIA-3, хранят при температуре -65°C или ниже или в лиофилизированном виде при 4°C.

v) Приготовление исходной вирусной суспензии.

Из флакона для культивирования клеток, содержащего сформированный пласт клеток, удаляют культуральную жидкость. Добавляют около 1 мл исходной вирусной

суспензии с известным титром (около 10^7 ТЦД₅₀/мл [50% доза инфицирования культуры ткани]), флакон инкубируют при $37\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Затем, добавляют 30 мл культуральной среды, и флакон снова инкубируют при $37\pm 2^\circ\text{C}$. Флакон часто обследуют, пока степень разрушения клеток не составит приблизительно 75% (примерно через 36-48 часов). Затем его замораживают при температуре -20°C или ниже для лизиса клеток.

Затем флаконы оттаивают и энергично встряхивают. Среду собирают и центрифугируют при 1500 g в течение 15 минут. Надосадочную жидкость разделяют на две порции (примерно по 0,5 мл) и помещают в маленькие пробирки, которые этикетировывают (дата и данные о вирусе), а затем хранят при температуре -65°C или ниже, пока они не понадобятся.

vi) Титрование исходной вирусной суспензии

Титрование исходной суспензии осуществляют методом Рида-Мюнча или методом Кербера, титр выражают в расчете на 50 мкл или на мл.

Для проведения реакции нейтрализации вируса требуется контрольная сыворотка, используемая как внутренний качественный контроль, с известным титром нейтрализующих антител к SHV-1 (следует провести калибровку данной сыворотки по отношению к международной стандартной сыворотке или по отношению к вторичному стандарту, приготовленному из нее), отрицательная контрольная сыворотка (от не имеющей специфических антител свиньи, например из официально свободного от болезни Ауески стада). Тестируемые сыворотки сами по себе должны быть хорошего качества, четко этикетированы, известного происхождения с клинической историей, должны постоянно храниться в охлажденном виде, быть свободны от грибковой и бактериальной контаминации, не гемолизированы и быть в достаточном количестве. Сыворотку крови следует безотлагательно отделить от коагулянта, предотвратив тем самым токсичность.

Существуют качественная и количественная процедуры для нейтрализации вируса, обе процедуры описаны ниже.

2.1.1. Качественный метод

- i) Комплемент в образцах сыворотки разрушают посредством нагревания на водяной бане при $56-59^\circ\text{C}$ в течение 30 минут.
- ii) Каждый образец неразведенной сыворотки помещают в две-три лунки, по 50 мкл в лунку, на 96-луночном титрационном микропланшете для культивирования клеток. Каждую сыворотку также можно развести $\frac{1}{2}$ в MEM до помещения в две другие лунки.
- iii) В каждую лунку добавляют 50 мкл вирусной суспензии, содержащей 100 ТЦД₅₀/50 мл (или 2×10^3 ТЦД₅₀/мл), полученной посредством разведения исходной вирусной суспензии с известным титром с помощью минимальной поддерживающей среды Игла.
- iv) Планшет встряхивают и помещают в инкубатор на один час при 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (присутствие 5% CO_2 необязательно).

- v) В каждую лунку добавляют 150 мкл клеточной суспензии, содержащей примерно 150 000 клеток/мл.
- vi) Планшет покрывают (для инкубации в CO₂) или осторожно запечатывают пластиковой пленкой по краям планшета (при инкубации на воздухе). Планшет слегка встряхивают для равномерного распределения клеток по дну лунок и помещают в инкубатор при 37°C (±2 °C) (присутствие CO₂ необязательно) на 3 – 5 дней.
- vii) *Контроли:* Каждый набор планшетов должен включать следующие контроли.

a) Вирусный контроль

Используется для подтверждения количества вируса, фактически используемого для теста. Дозу вируса, используемую для реакции вирус нейтрализации (целевой титр 100 ТЦД₅₀/мл) разводят минимальной поддерживающей средой Игла 1/10, 1/100 и 1/1000. Из каждого разведения 50 мкл помещают, как минимум, в четыре лунки, затем в каждую лунку добавляют по 50 мкл среды, затем лунки инкубируют в течение 1 часа при 37°C (±2 °C). Добавление суспензии клеток осуществляют таким же образом, как и добавление сыворотки, подлежащей тестированию.

b) Клеточный контроль

В каждую из, как минимум, четырех лунок помещают 150 мкл клеточной суспензии и 100 мкл минимальной поддерживающей среды Игла.

c) Контрольная положительная сыворотка

Используют сыворотку крови с известным титром нейтрализующих антител к SHV-1. Получают пять разведений таким же образом, как для сыворотки крови, подлежащей тестированию: разведение, соответствующее титру сыворотки крови, двукратное и четырехкратное разведения и разведения в ½ и в ¼ (эквивалентно T, T/2, T/4, 2T и 4T, где T – титр сыворотки крови, т.е. неразведенная сыворотка крови для качественного теста). К 50 мкл разведений положительного контрольного образца добавляют 50 мкл вирусной суспензии, содержащей 100 ТЦД₅₀/50 мкл. Клетки инкубируют, клеточную суспензию добавляют так же, как и производят добавление сывороток крови, подлежащих тестированию.

d) Контрольная сыворотка крови

Используется для подтверждения отсутствия токсического воздействия сывороток крови на клетки. Лунки, содержащие 50 мкл каждой сыворотки крови, инкубируют в течение 1 часа при 37°C в присутствии 50 мкл среды. Затем, добавляют 150 мкл суспензии клеток таким же образом, как и сыворотки крови, подлежащие тестированию.

e) Отрицательная контрольная сыворотка крови

С ней производят те же манипуляции, что и с сыворотками крови, подлежащими тестированию.

viii) *Считывание результатов.* Через 48 и 72 часа лунки обследуют на наличие токсического действия и цитопатогенного действия, используя микроскоп с инвертированным изображением (x100). Для признания тестов достоверными, контроли должны давать следующие результаты:

a) Вирусный контроль

Титр вирусной суспензии должен быть в пределах от 30 до 300 ТЦД₅₀/50 мкл.

b) Клеточный контроль

Пласт клеток должен быть интактным.

c) Положительная контрольная сыворотка крови

Полученный титр должен быть равен прогнозируемому титру в рамках одного разведения.

d) Сывороточный контроль

При обследовании на наличие цитопатогенного действия следует принимать во внимание возможное токсическое воздействие на клетки.

e) Отрицательная контрольная сыворотка крови

Должно наблюдаться цитопатогенное действие.

ix) Для тестируемых сывороток могут наблюдаться следующие результаты: присутствие ЦПД в трех лунках - отрицательный результат; отсутствие ЦПД в трех лунках на 3-ий день - положительный результат; присутствие ЦПД в одной лунке и отсутствие в других - сомнительный результат, тест необходимо повторить; маленькие бляшки, указывающие на наличие ЦПД в день 3 - сомнительный результат, тест необходимо повторить; токсичность в сывороточном контроле и тест-лунках - не поддающийся считыванию результат, тест необходимо повторить (NB: замена среды свежей средой через 16 часов инкубации снижает токсичность, не оказывая негативного влияния на титр специфических антител). Считывание планшетов можно производить до пятого дня инкубации. Если сыворотка крови изначально была разведена 1/2, она считается положительной, если ЦПД отсутствует в двух лунках. Разведение сыворотки крови до 1/2 может предотвращать токсическое воздействие тестируемой сыворотки крови.

x) *Интерпретация результатов.* Данный тест способен обнаруживать присутствие или отсутствие нейтрализующих антител к SHV-1. Он не способен дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных животных.

Описанный метод (реакция нейтрализации вируса в течение 1 часа при 37°C) может давать ложноотрицательные и ложноположительные результаты. Чувствительность метода можно повысить (это приводит к уменьшению количества ложноотрицательных результатов), приняв метод, в основе которого

лежит нейтрализация, включающая контакт между сывороткой крови и вирусом в течение 24 часов при 4°C перед добавлением клеток.

Качественный метод, такой как данный метод, в котором используется образцы неразведенной сыворотки крови (конечное разведение: 1/2), может также в определенных случаях давать ложно положительные результаты из-за неспецифической нейтрализации вируса. Данную проблему можно решить, посредством проведения подтверждающего теста с использованием количественного метода (смотри ниже).

2.1.2. Количественный метод

Данный метод сходен с качественной процедурой, но каждая сыворотка крови используется как неразведенной, так и в серии разведений. В зависимости от желаемой степени точности, цели тестирования и ожидаемого титра для каждого разведения используются две лунки и больший или меньший диапазон разведений. В идеале можно описать процедуру для диапазона разведений, достигающего первоначального максимума в 1/256, с тремя лунками для каждого разведения.

- i) Разрушение комплемента в образцах сыворотки производят посредством нагревания на водяной бане при 56°C в течение 30 минут.
- ii) В лунки A3 до A6 на 96-луночном титрационном микропланшете для культивирования клеток добавляют 50 мкл минимальной поддерживающей среды Игла.
- iii) В лунки A1-A3 добавляют 50 мкл неразведенной сыворотки крови, и продолжают добавлять другие образцы сыворотки крови в лунки рядов B, C и т.д.
- iv) Используя многоканальную пипетку, содержимое лунок в ряде 3 перемешивают, затем 50 мкл переносят в лунки ряда 4 и так далее до ряда 6 или последующего предварительно определенного ряда, причем используются те же наконечники. Порции в 50 мкл, оставшиеся после последнего ряда выбрасывают.
- v) Размещение контролей производят как при качественном методе.
- vi) В лунки ряда 1 вместо вируса добавляют 50 мкл минимальной поддерживающей среды Игла: это контрольный ряд сывороток. В лунки других рядов добавляют вирусную суспензию. Последующие манипуляции такие же, какие описаны для качественного метода.
- vii) *Считывание результатов.* Нейтрализующий титр сыворотки выражают через знаменатель наивысшего первоначального разведения, дающего почти полную нейтрализацию ЦПД вируса в 50% лунок. Нейтрализация при любом разведении (даже в неразведенном виде, что эквивалентно конечному разведению в 1/2) считается положительным результатом. Если нейтрализация наблюдается только в неразведенных сыворотках (при наличии роста вируса и ЦПД при разведении в 1/2 и последующих разведениях), для подтверждения результата было бы целесообразно применить альтернативные тесты (ИФА или

реакцию латекс-агглютинации) или попросить произвести еще один отбор образцов у животного, как минимум, через 8 дней после первого.

b) Иммуноферментный анализ (предписанный тест для международной торговли)

Чувствительность иммуноферментного анализа (ИФА) обычно выше, чем у реакции нейтрализации вируса, если процесс нейтрализации занимает 1 час и без комплемента. Некоторые слабopоложительные сыворотки легче обнаружить в реакции нейтрализации вируса с использованием 24-х часового периода нейтрализации, тогда как другие легче обнаружить посредством ИФА.

В имеющихся в продаже ИФА-наборах для определения уровней антител используются непрямой или конкурентный методы. Они отличаются по способу подготовки антигена, конъюгата или субстрата, периоду инкубации и интерпретации результатов. Общим преимуществом их использования является возможность быстро обработать большое количество образцов. Процесс можно также автоматизировать и производить анализ результатов с помощью компьютера. С помощью некоторых из таких наборов при использовании «соответствующей» вакцины (Eloit *et al.*, 1989; Van Oirschot *et al.*, 1986) можно дифференцировать вакцинированных и естественно инфицированных животных. Альтернативно, возможно утверждение некоммерческих протоколов ИФА (Toma & Eloit, 1986), при условии, что в отношении них установлено, что они обнаруживают международную стандартную эталонную сыворотку МЭБ, в виде положительного результата при разведении в $\frac{1}{2}$ (минимальная чувствительность для целей международной торговли). Рекомендуется использовать набор или внутренний тест, т.е. разработанный на месте, валидация которого по отношению к данному стандарту была произведена независимой лабораторией с использованием внешних тестов контроля качества. Ниже представлен подходящий протокол теста для выявления антител к цельному вирусу (Toma & Eloit, 1986).

2.2.1. Приготовление антигена

- i) Используется клеточная линия, чувствительная к SHV-1, такая как РК-15 или фетальный свиной семенник. Она не должна содержать посторонних вирусов, таких как вирус вирусной диареи КРС. За день до инокуляции клетки следует расщепить и высеять в свежие 75 см² матрасы. Культуры покрывают слоем из подходящей среды, такой как минимальная поддерживающая среда Игла без сыворотки крови.
- ii) Обработка матрасов, инокулированных вирусом, и контрольных, неинокулированных матрасов осуществляется параллельно в течение всего эксперимента. Используют подходящий хорошо охарактеризованный штамм SHV-1, например, штамм Којноск. Когда сформировался конфлюэнтный клеточный монослой (приблизительно через 24 часа после посева), его инокулируют 10^8 ТЦД₅₀ SHV-1 в 5 мл среды, а в контрольные матрасы помещают 5 мл среды (без вируса). Культуры оставляют для адсорбции на 30 минут при 37°C, а затем поверх наносят слой среды, 20 мл.
- iii) Сразу же после начала развития цитопатогенного действия, надсадочную среду удаляют и добавляют 4 мл КС1 (4 мМ раствор) и стеклянные гранулы. Затем матрасы осторожно встряхивают для отделения клеток.

- iv) Клетки отмывают посредством центрифугирования, 3 раза при 770 *g* в 4 мМ KCl. Осадок ресуспендируют в 4 мМ KCl с 2% Triton X-100 (1 мл на один матрас), производя 60 круговых движений стеклянным гомогенизатором.
- v) Клеточный гомогенат наносят слоем на 0,25 мМ сахарозу в 4 мМ KCl и центрифугируют в течение 10 минут при 770 *g*.
- vi) Осадок ресуспендируют в буфере для разведения антигена, pH 9,6 (0,1 М Tris, 2мМ ЭДТК, 0,15 мМ NaCl) в объеме равном 1/50 объема первоначальной культуральной среды. Затем его можно хранить в небольших аликвотах при -70°C. В таком виде антиген остается стабильным в течение 2 лет.

2.2.2. Сенсibilизация титрационных микропланшетов

- i) Вирусный антиген и контрольный (без вируса) антиген разводят в буфере для разведения, pH 9,6 (смотри выше) до получения разведения, заранее определенного в титрованиях методом "шахматной доски".
- ii) В каждую лунку 96-луночного ИФА-планшета помещают 200 мкл антигена, сенсibilизируя ряды поочередно, то антигеном SHV-1, то контрольным антигеном. Инкубируют в течение 18 часов при 4°C.
- iii) Планшеты промывают три раза раствором для промывания (Твин 20, 0,5 мл/литр).
- iv) Покрытые планшеты хранят при -20°C или при -70°C. Они остаются стабильными в течение нескольких месяцев.

2.2.3. Процедура теста

- i) Образцы тестируемой сыворотки разводят 1/30 в ФБР/Твин буфере, pH 7,2 (137 мМ NaCl, 9,5 мМ фосфатный буфер, 0,5 мл/литр Твин 20).
- ii) Разведенные образцы добавляют в лунки, сенсibilизированные вирусным и контрольным антигеном, и инкубируют при 37°C в течение 30 минут.
- iii) Планшеты промывают три раза раствором для промывания (0.5 мл/литр Твин 20).
- iv) Во все лунки добавляют конъюгат белка А/пероксидазы в заранее определенном разведении в ФБР/Твин буфере, pH 7,2 (см. выше) с добавлением фракции V альбумина бычьей сыворотки (10 г/литр). Планшеты инкубируют при 37°C в течение 30 минут.
- v) Планшеты промывают три раза раствором для промывания (0.5 мл/литр Твин 20).
- vi) На каждый планшет наносят соответствующую смесь хромогена/субстрата, такую как тетраметил бензидин (ТМБ)/перекись водорода.
- vii) Остановку реакции производят с помощью 2М серной кислоты. Показатели абсорбции считывают при 492 нм.

Тест должен пройти полную валидацию с использованием известных положительной и отрицательной сывороток и калибровку по отношению к международной стандартной эталонной сыворотке крови МЭБ. Во все тесты должны быть включены положительные и отрицательные внутренние контроли, включая слабopоложительный контроль, который при разведении до соответствующего для теста уровня разведения имеет активность, эквивалентную 1/2 разведения международной стандартной эталонной сыворотки крови МЭБ. Подробная информация представлена у Toma & Eloit, 1986 и в Главе I.1.6. Принципы и методы валидации диагностических анализов для инфекционных болезней. Коммерческие ИФА-наборы также подлежат валидации в тех же условиях, в которых их намереваются использовать.

Также как и тестируемые сыворотки крови ИФА можно адаптировать для тестирования пулов сыворотки крови, на дисках из фильтровальной бумаги, смоченных небольшим количеством крови, полученной посредством пункции из поверхностной вены (Banks, 1985; Toma *et al.*, 1986.) или мышечного экссудата (Le Potier *et al.*, 1998). Такой метод удобен при отборе проб крови от большего количества свиней (Vannier *et al.*, 2007). Перед отправкой в лабораторию диски высушивают на воздухе.

Некоторые контролирующие органы власти установили требования к обнаружению gE антител посредством ИФА у свиней, предназначенных на убой, которых ввозят в зоны, свободные от болезни Ауески (Европейская Комиссия, 2008). В Кодексе МЭБ по наземным животным указаны обстоятельства, когда можно использовать gE-специфические тесты. gE ИФА-тесты можно также адаптировать для тестирования образцов крови на дисках из фильтровальной бумаги в зависимости от степени чувствительности.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Обоснование

1.1. Принцип и предполагаемое использование продукта

Контроль болезни Ауески можно осуществлять посредством использования вакцин, содержащих либо модифицированные живые, либо инактивированные вирусные антигены. Кроме того, в последнее время к этим традиционным вакцинам добавились полученные из рекомбинантной ДНК ген-делетированные вакцины или естественно делетированные живые вакцины против SHV-1. Эти вакцины, иногда называемые маркерные вакцины, получены из вируса, у которого отсутствует специфический гликопротеин (чаще всего gE, хотя также описаны и вакцины с делетированным gG или gC¹). Как минимум, одна имеющаяся в продаже вакцина, имеет двойные делеции. Преимущество данных маркерных ген-делетированных вакцин по сравнению с традиционными вакцинами из цельного вируса состоит в том, что они дают возможность дифференцировать неинфицированных вакцинированных животных и животных с полевой инфекцией. Это производится посредством тестирования на наличие антител, направленных против белка, кодируемого делетированным геном, который у неинфицированных вакцинированных маркерной вакциной свиней будет отсутствовать, и

¹ Номенклатура для генов изменилась несколько лет назад, но в литературе все еще сохраняется прежнее обозначение. Прежняя и новая номенклатура такова: gII = gB; gIII = gC; gp50 = gD; gI = gE; gX = gG; gp63 = gI.

присутствовать у свиней, инфицированных в полевых условиях. Поэтому, в странах, где есть инфицированные свиньи и планируется искоренение болезни Ауески, предпочтительно использовать такие маркерные вакцины (Pensaert *et al.*, 1992; 2004). Описаны стандарты, применяемые к производству живых и инактивированных противовирусных вакцин. Для маркерных вакцин тесты должны включать демонстрацию отсутствия у вакцинированных свиней серологической реакции на белок, кодируемый делетированным геном, и дополнительно выявляемую реакцию на тот же белок у вакцинированных свиней, инфицированных полевым вирусом.

Другие вакцины являются инактивированными и представляют собой адьювантированную вирусную субъединицу очищенных и концентрированных иммуногенных гликопротеинов (за исключением gE), что позволяет провести дифференциацию между вакцинированными и инфицированными свиньями.

Руководство по производству ветеринарных вакцин представлено в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, изложенные в данной главе и в Главе 1.1.8., намеренно имеют общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

2. Описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

В основе производства вакцин лежит система производства посевного материала партиями, в которой исходный посевной вирус (MSV) получают из подходящего штамма вируса болезни Ауески. Для производства вакцины используется ряд штаммов. Антиген для инактивированной вакцины может быть получен из ряда штаммов дикого типа или делетированного естественным путем вируса Bucharest. Для модифицированных живых традиционных вакцин используют многочисленные штаммы, такие как Bartha или их получают из оригинального изолята вируса болезни Ауески или из других полевых изолятов, таких как штамм NIA-3 (Marchioli *et al.*, 1987; McFerran & Dow, 1975; Van Oirschot *et al.*, 1990; Visser & Lutticken, 1988).

Для дифференциации инфицированных и вакцинированных животных рекомендуется использовать делетированные штаммы.

Тест на идентичность вируса (с использованием либо реакции иммунофлуоресценции, реакции нейтрализации, [метод: неизменяемая сыворотка/уменьшение количества вируса], либо любого другого подходящего теста на идентичность) должен проводиться на исходном посевном вирусе.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, отсутствие посторонних агентов)

Большинство клеточных линий, используемых для размножения SHV-1, - это перевиваемые линии, такие как линия РК-15. Матровая расплодка клеток (MCS) создается на определенном пассажном уровне. Матровая расплодка клеток и ее наивысший пассажный уровень (MCS × n), предназначенные для использования в приготовлении биологического продукта, указаны в Основных принципах производства. Контроль и матровой расплодки клеток, и матровой расплодки клеток ×

и осуществляют с помощью различных процедур, для того, чтобы охарактеризовать клеточную линию и обеспечить отсутствие посторонних агентов. Выявляемые посторонние вещества в целом описаны в монографиях и/или руководствах (напр. Европейская фармакопея. Кодекс федеральных законов США, руководства ЕС и т.д.). В целом тип веществ, подлежащих контролю, основан на анализе риска, в зависимости от истории вирусного штамма и клеток, на которых вакцинный штамм был выделен и на которых он культивируется. Матровую расплодку клеток необходимо контролировать на виды происхождения. Минимум 50 митотических клеток следует исследовать как на уровне матровой расплодки клеток, так и на уровне МРК \times n. Модальное число в формуле MCS \times n не должно превышать 15% модального числа матровой расплодки клеток. Все маркерные хромосомы в матровой расплодке клеток должны также быть представлены на самом высоком пассажном уровне клеток.

Если есть признаки того, что клеточная линия может индуцировать злокачественные образования у видов животных, для которых этот продукт предназначается, клеточную линию следует протестировать на туморогенность и онкогенность.

В отношении исходного посевного вируса и матровой расплодки клеток должно быть продемонстрировано, что они не содержат микоплазм, бактерий, грибов, цитопатогенных и гемадсорбирующих вирусов, парвовируса свиней, цитопатических и нецитопатических пестивирусов овец и КРС и других посторонних агентов, таких как цирковирус, что определяется посредством культивирования и процедур с использованием флуоресцирующих антител или других методов, таких как ПЦР.

2.2 Метод производства

2.2.1 Процедура

Только тот исходный посевной вирус, который был признан чистым, безопасным и иммуногенным, может использоваться в качестве посевного материала для производства вакцины. Клетки из матровой расплодки клеток размножаются в различных ростовых средах. Все партии вакцины должны быть взяты от первого до двадцатого пассажа матровой расплодки клеток.

2.2.2. Контроль в процессе производства

Необходимо проводить тестирование на каждом критическом этапе процесса производства. Контрольные тесты также проводят на промежуточных продуктах с целью проверки соответствия процесса производства и конечного продукта.

2.2.3. Тестирование партий конечного продукта

Важно различать тесты, которые проводятся на рутинной основе для выпуска партий конечного продукта в реализацию и те, которые проводятся для определения биологических свойств вакцины. Опыты, проводимые при выпуске партии в реализацию, отличаются от опытов, проводимых только один раз для определения безопасности и эффективности вакцины. Контрольные меры при выпуске партии в реализацию – это всегда краткосрочные опыты, недорогие, насколько это возможно, и не всегда проводимые на свиньях. Их цель, в основном, подтвердить воспроизводимость качества конечного продукта, которое должно соответствовать

качеству, изначально определенному в заявке на получение регистрационного свидетельства.

i) Стерильность и чистота

Должны проводиться тесты на стерильность и свободу от контаминации (см. Главу 1.1.9 и раздел С.2.1.2. этой главы).

Каждая партия вакцин против SHV-1 должна быть протестирована на свободу от посторонних вирусов. С помощью минимального количества моноспецифической антисыворотки живой вакцинный штамм нейтрализуется и инокулируется в культуры клеток, о которых известно, что они чувствительны к вирусам, патогенным для свиней. Не должны выявляться цитопатогенное действие и гемадсорбирующие агенты. Вакцины должны быть свободны от пестивирусов.

ii) Инактивация

Для инактивированных вакцин, инактивация должна проверяться с помощью двух пассажей в том же типе культуры клеток, которая использовалась в производстве вакцины. Тесты можно проводить посредством вакцинации восприимчивых животных, таких как кроликов.

iii) Идентичность

При необходимости, следует провести специфический тест на идентификацию вируса.

iv) Безопасность

Безопасность живых вакцин проверяется посредством введения десяти доз восстановленной вакцины путем, указанным во вкладыше, по меньшей мере, двум пороссятам в минимальном возрасте, рекомендуемом для вакцинации, не имеющим антител к SHV-1. Двух поросят одинакового происхождения и возраста оставляют в качестве контролей. Не должно возникать никакой аномальной местной или системной реакции. Кривая веса вакцинированных поросят не должна значительно отличаться от кривой контролей.

Что касается инактивированных вакцин, то их безопасность проверяется посредством введения двух доз пороссятам при тех же условиях, как описано выше.

v) Иммуногенность партии

Иммуногенность вакцины должна быть продемонстрирована с помощью подходящего метода, результаты которого должны согласовываться с результатами тестов на эффективность, описанных выше.

В этом типе теста наиболее сложный момент – это определить порог приемлемости для использования или выбраковки партии в соответствии с полученными результатами.

Тесты на содержание вируса должны проводиться с использованием, как минимум, трех контейнеров. Следует определить вирусный титр вакцины, который обычно не

должен превышать 1/10 дозы, при которой было продемонстрировано, что вакцина безопасна и не ниже минимального титра выпуска в реализацию.

vi) Консерванты

Если консерванты не были включены в конечный продукт, производитель должен продемонстрировать, что продукт остается приемлемым в течение рекомендованного периода для использования после вскрытия флакона.

Следует продемонстрировать эффективность консервантов в многодозовых контейнерах. Следует проверить концентрацию консерванта в конечной фасованной вакцине и его устойчивость на протяжении всего срока годности.

vii) Меры предосторожности (опасности)

Следует указать всю информацию о возможных нежелательных реакциях, индуцируемых вакциной. Следует также указать любой вероятный риск для здоровья человека, если пользователю случайно будет введено небольшое количество препарата. Производитель должен указать все условия использования вакцины: смешивание, восстановление, хранение, асептику, длину иглы, путь введения, состояние здоровья вакцинируемых животных.

2.2.4. Тесты на стабильность

Следует проводить тестирование для подтверждения срока годности, заявленного производителем. Данные тесты должны всегда представлять собой исследования в реальном времени; они должны проводиться на достаточном количестве партий (как минимум три), произведенных в соответствии с описанным процессом производства, и на продуктах, хранящихся в конечном контейнере, и обычно включают тесты на биологическую и физико-химическую стабильность. Производитель должен предоставить результаты анализов, которые подтверждают предлагаемый срок годности при всех предлагаемых условиях хранения. Обычно предлагаемая продолжительность срока годности соответствует периоду, в течение которого продукт считается стабильным минус три месяца.

2.3. Требования к регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

Следует исследовать местные и общие реакции. При использовании живой вакцины необходимо дифференцировать точные безопасные свойства вакцинного штамма от таковых конечного продукта, если данный продукт содержит адъювант.

Следует применять объективные и поддающиеся количественному определению критерии для выявления и измерения нежелательных реакций; они должны включать температурные изменения, привесы, размер помета, репродуктивность и т.д. у вакцинированных и контрольных групп. Тесты могут проводиться посредством введения вакцины свиньям в рекомендуемой дозе и каждым из рекомендуемых путей введения.

В целом безопасность тестируется изначально в экспериментальных условиях, в соответствии с требованиями *Ветеринарно-санитарного кодекса МЭБ по наземным животным, Глава 7.8. Использование животных в научных исследованиях и в образовательных целях*. Если результаты этих предварительных тестов известны, необходимо увеличить количество вакцинированных животных с целью оценки безопасности вакцины в практических условиях.

i) Лабораторное тестирование

Все тесты должны проводиться на свиньях, которые не имеют антител к вирусу болезни Ауески или против субъединицы вируса.

а. Общее воздействие

1. Живые вакцины

Для выяснения степени безопасности штамма очень полезны интраназальные тесты и вакцинация 3-5-ти дневных поросят. Следует использовать, как минимум, пять поросят.

Также необходимо произвести оценку свойств вакцины, особенно если это живая вакцина, на целевых животных в обычных условиях её использования и на самых молодых животных, подлежащих вакцинации, например, поросят на откорме, которых обычно вакцинируют в возрасте от 9 до 12 недель, и на супоросных свиноматках, когда данное использование вакцины заявлено производителем и санкционировано. После вакцинации не должно наблюдаться никаких клинических признаков, включая значимые термические реакции (данные должны регистрироваться до вакцинации, и через 6, 24 и 48 часов после вакцинации, затем ежедневно во время периода наблюдения). Данные тесты следует проводить на, как минимум, десяти вакцинированных свиньях с включением пяти невакцинированных свиней, в качестве контролей.

Необходимо провести тест на возврат к вирулентности после серийного пассирования. Первичную вакцинацию проводят интраназальным путем. На поросятах проводят серию пассажей, как минимум, четыре. Для каждого пассажа необходимо использовать не менее двух полностью восприимчивых животных.

Цель данных анализов – протестировать генетическую стабильность живых вакцинных штаммов. При использовании генетически модифицированного живого штамма такие тесты менее необходимы, особенно, если в данном штамме произведена делеция гена.

Рекомендуется провести тестирование на возможное выделение вакцинного штамма в среду. Для этого используют не менее чем 14 поросят в возрасте 3-4 недель. Каждому из этих поросят вводят по одной дозе вакцины рекомендуемым путем и в рекомендуемый участок (кроме вакцин, вводимых интраназально). В качестве контактных контролей используют четырех невакцинированных поросят. Отдельно на назальных и оральных секретах проводят имеющие соответствующую степень чувствительности тесты на наличие вируса. Данные тесты проводят следующим образом: ежедневно отбирают мазки из носовой и ротовой полости, начиная со дня 1 до вакцинации и до дня 10 после вакцинации. Не рекомендуется использовать

вакцинные штаммы, выделяемые из назальных/оральных секретов, отобранных от свиней, которым вакцину вводили парентеральным путем.

Необходимо протестировать способность вакцинного штамма вируса болезни Ауески распространяться от вакцинированных свиноматок к невакцинированным свиноматкам (латеральное распространение), используя рекомендуемый путь введения, при котором риск распространения вируса наивысший (кроме вакцин, вводимых интраназально). Поскольку данное явление с трудом поддается обнаружению, необходимо повторять анализы (четыре раза). Каждый раз следует использовать четырех поросят, их вакцинируют и спустя один день помещают в контакт с двумя невакцинированными поросятами. Возможно, понадобится проверить, передается ли данный штамм нецелевым видам животных, которые могут быть восприимчивы к данному вакцинному штамму.

Живые аттенуированные вакцинные штаммы тестируют в отношении их основного воздействия, вводя 5-10-ти дневным поросятам полевую дозу десять раз. Введение избыточной дозы делает возможным обнаружение реакций, которые не продуцируются при нормальных условиях использования. Такие реакции могут быть продуцированы по недосмотру при вакцинировании большого количества животных. Если вакцины вводятся интраназально, производитель должен четко указывать, что вакцина будет распространяться от вакцинированных поросят на невакцинированных.

2. Инактивированные вакцины

Инактивированные вакцины необходимо тестировать на целевых животных в нормальных условиях использования для свиней на откорме и для свиноматок, если такое использование вакцин заявлено производителем и разрешено (Европейская фармакопея, 2008 г., Vannier *et al.*, 2007). Как указывалось ранее, для обнаружения и измерения неблагоприятных реакций у вакцинированных и контрольных групп важно использовать объективные и поддающиеся количественному определению критерии, такие как изменение температуры, продуктивность по привесам, размер помета, репродуктивная способность и т.д. Данные тесты следует проводить, вводя вакцину свиноматкам, для которых она предназначена, в рекомендуемой дозе и каждым из рекомендуемых путей.

Обычно свиноматки или свиноматки содержат под наблюдением и подвергаются обследованию до исчезновения любой реакции. Период наблюдения не должен быть короче, чем 14 дней со дня введения. Данный период следует продлевать, когда, например, вакцина используется для супоросных свиноматок или в случае, когда необходимо оценить возможное воздействие вакцины на репродуктивную способность. В этом случае наблюдение продолжается в течение всего периода супоросности.

Контролирующие власти обычно рекомендуют вакцинацию двойной дозой с тем, чтобы увеличить вероятность обнаружения неблагоприятных реакций, которые могут находиться у предела обнаружения при введении единичной дозы.

в. Местные реакции

Местные реакции часто ассоциируются с использованием инактивированных вакцин, поскольку данные побочные реакции могут быть индуцированы адъювантами, особенно масляными адъювантами (Vannier *et al.*, 2006). Однако некоторые живые

вакцины против болезни Ауески смешивают с различными адъювантами, что изменяет ситуацию, которая наблюдалась в прошлом.

Местные реакции – это главным образом воспалительные реакции с возможными осложнениями в большей или меньшей степени (некротические или гнойные) в зависимости от природы используемых адъювантов и асептических условий вакцинации. Масляные адъюванты могут индуцировать разнообразные воздействия, включая дегенерацию мышц, гранулему, фиброз, образование абсцессов. Кроме природы используемого масла (при использовании в вакцинах метаболизируемых масел, преобразующихся в ходе обмена веществ, интенсивность реакции снижается) эти реакции в большей или меньшей степени обусловлены типом используемой эмульсии (вода/масло, масло/вода, вода/масло/вода). Следовательно, место введения необходимо исследовать не только снаружи, но также посредством рассечения после убоя, особенно у свиней, находящихся на доращивании и последней стадии откорма.

ii) Тестирование в полевых условиях

Для оценки безопасности вакцины против болезни Ауески необходимы полевые опыты на больших количествах свиней или свиноматок. В Европе (Европейская Фармакопея, 2008 г.), тесты должны проводиться на каждой категории животных, для которых предназначается вакцина (свиноматки, свиньи на откорме). Используют, как минимум, три группы по, не менее чем, 20 животных в каждой с соответствующими группами контролей, включающими не менее 10 животных. Во время вакцинации и через 6, 24 и 48 часов после вакцинации у каждого животного измеряют ректальную температуру. Во время убоя необходимо обследовать место введения вакцины на наличие местных реакций. Если вакцина предназначена для свиноматок, следует регистрировать их репродуктивную способность. В дополнение к полевым опытам проводят лабораторные исследования эффективности, скоррелированной с иммуногенностью вакцины.

2.3.2. Тестирование на эффективность

i) Лабораторные опыты

Все тесты необходимо проводить на свиньях, у которых отсутствуют антитела против вируса болезни Ауески или против субъединицы данного вируса, кроме некоторых тестов, которые могут проводиться с использованием животных с материнским иммунитетом.

а. Оценка пассивного иммунитета

Для тестирования эффективности вакцин важно имитировать условия заражения естественным путем (Европейская Комиссия, 2008). Заражение SHV-1 вызывает большие потери среди маленьких поросят, родившихся от неиммунных свиноматок. Таким образом, основной целью при вакцинировании свиноматок является защита маленьких поросят через пассивный иммунитет, предоставляемый с молозивом, потребляемым ими сразу же после рождения, а второй целью - предотвращение аборт.

Для определения уровня данного пассивного иммунитета и степени защиты, индуцируемой при вакцинации свиноматок, были созданы экспериментальные модели. Свиноматок вакцинируют согласно протоколу вакцинации в течение периода

супоросности. Когда поросята достигают возраста, например, 6-10 недель, их интраназально заражают вирулентным штаммом SHV-1. Предпочтительно использовать штамм, титрованный в средних летальных дозах (LD_{50}). Свиней следует прививать интраназально, $10^2 LD_{50}$ на свинью в 1 мл. Оценку эффективности вакцины производят, сравнивая клинические признаки, а также, что более важно, уровень смертности среди поросят от невакцинированных свиноматок с уровнем смертности среди поросят от вакцинированных свиноматок.

У поросят от вакцинированных свиноматок степень защиты от смертности может составлять 80% по сравнению с поросятами от контрольных свиноматок. Для того, чтобы результат был значимым, рекомендуется использовать восемь вакцинированных свиноматок и четыре контрольных свиноматки (при условии достаточного количества поросят от каждой свиноматки).

в. Оценка активного иммунитета

1. Защита от клинической формы болезни

При оценке уровня активного иммунитета, вырабатываемого вакцинированными свиньями, можно учитывать несколько критериев. Как правило, свиней вакцинируют в начале периода дорастивания, т.е. когда они находятся в возрасте между 9 и 12 неделями. В лаборатории опыты проводят посредством контрольного заражения свиней в конце заключительной стадии откорма, когда они весят от 80 до 90 кг.

Обычно для определения степени защиты свиней от развития клинической формы болезни после вакцинации и контрольного заражения используют, как минимум, три критерия, такие как ректальная температура, потеря веса и клинические признаки вместе с уровнем смертности (De Leeuw & Van Oirschot, 1985). Значимость титра антител в плане прогнозирования степени эффективности вакцин мала. Когда условия контрольного заражения хорошо стандартизированы, наиболее воспроизводимым и достоверным параметром является потеря веса при сравнении показателей вакцинированной и контрольной групп. Количественно определенная разница в приросте массы тела или в потере массы между двумя группами поросят в определенный интервал времени после контрольного заражения (день 0 и день 7) имеет очень хорошую значимость в плане прогнозирования степени эффективности вакцины (Stellmann *et al.*, 1989). Значимые результаты можно получить при сравнении показателей продуктивности по массе одной группы, включающей не менее восьми вакцинированных свиней, с показателями продуктивности по массе другой группы из восьми невакцинированных контрольных свиней.

Для контрольного заражения обычно предпочтительнее использовать высокий титр вирулентного штамма, поскольку при этом возможно сделать более выраженной разницу между вакцинированными и контрольными свиньями. Исходя из предыдущей работы для контрольного заражения достаточной может быть доза, равная, как минимум, 10^6 ТЦД₅₀/мл вирулентного штамма, подвергнутого не более чем трем пассажам на первичных клетках, но рекомендуется использовать более высокий титр ($10^{7.5}$ ТЦД₅₀/мл). Для контрольного заражения свиней следует использовать орально-назальный путь, вводя вирулентный штамм в соответствующем большом объеме (≥ 4 мл).

В настоящее время данный метод оценки эффективности вакцин против SHV-1 хорошо исследован и дает возможность установить объективный индекс для

определения степени эффективности вакцины. Данный индекс, который сравнивает относительные потери массы у вакцинированных и контрольных свиней, можно также использовать для исследования иммуногенности партий перед выпуском в реализацию и для тестирования эффективности партии. Однако величина индекса точки разделения (cut-off index) будет различной, поскольку условия проведения анализа не будут идентичными. Необходимо провести надлежащую оценку влияния пассивно приобретенных материнских антител на эффективность вакцины.

2. Экскреция вирулентного вируса

К тому же, желательно, чтобы вакцины предотвращали или хотя бы ограничивали экскрецию вируса у инфицированных свиней (Vannier *et al.*, 1991). Когда в основе программы контроля болезни Ауески лежит широкомасштабная вакцинация, главное – выбрать такие вакцины и схемы вакцинации, которые лучше всего ограничивают репликацию вирулентного вируса у инфицированных свиней. Для сравнения вакцин на этой основе было проведено несколько анализов.

В целом, свиней вакцинируют и контрольно заражают в разные периоды. Лучше, но для этого требуется больше времени, инфицировать свиней на последней стадии откорма. Для определения уровня экскреции вируса ежедневно у каждой свиньи, начиная за день до контрольного заражения и, как минимум, до дня 12 после контрольного заражения, берут мазки из носа (из ноздрей на глубине 10 см). Для определения точного веса собранной слизи тампоны для взятия мазков можно взвесить до проведения процедуры отбора образцов и сразу же после нее. Затем в каждую пробирку с материалом мазка добавляют среду. Вирус титруют из замороженной и оттаянной среды.

Для выражения количества вирулентного вируса, выделяемого свиньями, могут быть использованы различные индексы, с учетом продолжительности и уровня экскреции вируса и количества свиней, выделяющих вирулентный вирус.

3. Продолжительность иммунитета

Рекомендуется, чтобы любые заявления относительно начала и продолжительности иммунитета были подтверждены данными, полученными в ходе испытаний. Оценка продолжительности иммунитета может основываться на опытах с использованием контрольного заражения или, насколько это возможно, на результатах иммунологических и серологических тестов.

ii) Полевые испытания

В целом, оценить эффективность вакцины в популяциях животных крайне трудно. Для того чтобы сделать это, необходимо вакцинировать животных в отсутствие патогена, от которого защищает вакцина, затем ожидать момента заражения и сравнивать воздействие инфекции на вакцинированных животных (или потомство вакцинированных животных) с воздействием на невакцинированных животных такого же возраста, из такого же здания и той же партии, что и вакцинированные животные (или животные с пассивной защитой). Поскольку в полевых условиях трудно соблюсти все эти условия, полевые испытания, несомненно, больше подходят для тестирования на безопасность, чем для тестирования на эффективность, за исключением разработки маркерных вакцин, которые предлагают возможность оценить эффективность вакцин в полевых условиях (Voima, 2005).

2.3.3. Стабильность

Следует проводить тестирование для подтверждения срока хранения, заявленного производителем. Данные тесты должны всегда представлять собой исследования в реальном времени; они должны проводиться на достаточном количестве партий (как минимум три), произведенных в соответствии с описанным процессом производства, и на продуктах, хранящихся в конечном контейнере, и обычно включают тесты на биологическую и физико-химическую стабильность. Производитель должен предоставить результаты анализов, которые подтверждают предлагаемый срок годности во всех предлагаемых условиях хранения. Обычно предлагаемая продолжительность срока годности соответствует периоду, в течение которого продукт считается стабильным минус три месяца.

3. Вакцины, основанные на биотехнологии

3.1. Доступные вакцины и их преимущества

Биотехнология в комбинации с лучшим знанием функций и характеристик гликопротеинов SHV-1 позволила разработать новые вакцины. Например, Quint et al. (1987) удалили последовательность, кодирующую гликопротеин E, из штамма NIA3. Это привело к получению эффективной маркерной вакцины против болезни Ауески, позволяющей проводить дифференциацию между вакцинированными животными и невакцинированными (вакцины DIVA). Большинство вакцин, используемых в данный момент, получены из вирусной ДНК с делециями генов. Делеция генов, кодирующих гликопротеин E, используется наиболее часто и позволяет получить аттенуированную живую вирусную вакцину, которая тем не менее защищает от клинических признаков и значительно сокращает уровень экскреции вируса, как вакцинированными, так и инфицированными свиньями. Поскольку некоторые гликопротеины SHV-1 могут индуцировать сильные иммунные ответы, была протестирована эффективность ДНК вакцин, состоящих из плазмид, кодирующих эти гликопротеины. Действительно, ДНК вакцина имеет ряд преимуществ: легкость конструирования и стандартизированное продуцирование плазмид, отсутствие манипуляций с инфекционными частицами, индукция гуморального и клеточного иммунного ответа, избегание влияния материнского иммунитета. Первое исследование, посвященное ДНК вакцинации против инфекции болезни Ауески, было опубликовано в 1997 г. (Gerdt et al., 1997). Использование новейшего поколения плазмид, амплифицирующих уровень транскрипции генов интересующих белков (Dory et al., 2005), было описано, в качестве эффективной стратегии. Коммерциализация этих вакцин пока не проведена.

3.2. Особые требования к биотехнологическим вакцинам, если таковые имеются

Критерии по оценке качества, безопасности и эффективности вакцин, полученных с помощью биотехнологий, такие же, как и для вакцин, называемых традиционными вакцинами (см. Раздел С.2). Тем не менее, особое внимание следует уделить стабильности конструкции рДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- BANKS M. (1985). DEtection of antibodies to Aujeszky's disease virus in whole blood by ELISA-disc. *J. Virol. Methods*, **12**, 41–45.
- BOUMA A. (2005). Determination of the effectiveness of pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials. *Biologicals*, **33**, 241–245.
- DE LEEUW P.W. & VAN OIRSCHOT J.T. (1985). Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. *Vet. Q.*, **7**, 780–786.
- DORY D., TORCHÉ A.M., BÉVEN V., BLANCHARD P., LOIZEL C. & CARIOLET R. (2005). Effective protection of pigs against lethal Pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins. *Vaccine*, **23**, 3483–3491.
- ELOIT M., FARGEAUD D., VANNIER P. & TOMA B. (1989). Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, **124**, 91–94.
- EUROPEAN COMMISSION (2008). Commission Decision of 21 February 2008 on additional guarantees in intra-Community trade of pigs relating to Aujeszky's disease and criteria to provide information on this disease 2008/185/EC: *Official Journal of the European Communities L* **316**, 5–35.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, SIXTH EDITION (2008). Monograph 0744: Vaccinum morbi Aujeszky ad suem inactivatum (inactivated Aujeszky's disease vaccine for pigs). Monograph 0745: Vaccinum morbi Aujeszky ad suem vivum ad usum parenterale (Aujeszky's disease live vaccine for pigs for parenteral administration). Council of Europe, Strasbourg, France.
- HOFFMAN B., BEER M., REID S.M., MERTENS P., OURA, C.A., VAN RIJN P.A., SLOMKA M.J., BANKS J., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & KING D.P. (2009). A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.*, **139** (1–2), 1–23.
- GERDTS V., JÖNS A., MAKOSCHEY B., VISSER N. & METTENLEITER T (1997). Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2139–2146.
- LE POTIER M.F., FOURNIER A., HOUDAYER C., HUTET E., AUVIGNE V., HERY D., SANAA M. & TOMA B. (1998). Use of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.*, **143**, 385–387.
- MA W., LAGER K.M., RICHT J.A., STOFFREGEN W.C., ZHOU F. & YOON K.J. (2008). Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20** (4), 440–447.
- MARCHIOLI C.C., YANCEY R.J., WARDLEY R.C., THOMSEN D.R. & POST L.E. (1987). A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein genes. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1577–1583.

- MENGELING W.L., LAGER K.M., VOLZ D.M. & BROCKMEIER S.L. (1992). Effect of various vaccination procedures on shedding, latency and reactivation of attenuated and virulent pseudorabies virus in swine. *Am. J. Vet. Res.*, **53** (11), 2164–2173.
- MCFERRAN J.B. & DOW C. (1975). Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **19**, 17–22.
- MOENNIG V., WOLDESENBERT P., FEY H.R., LIESS B., DOPOTKA H.D. & BEHRENS F. (1982). Comparative evaluation of ELISA and neutralization test for the diagnosis of Aujeszky's disease. *In: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 17. Aujeszky's Disease*, Wittmann G. & Hall S.A., eds. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 51.
- PEJSAK Z.K. & TRUSZCZYNSKI M. (2006). Aujeszky's disease (Pseudorabies). *In: Diseases of Swine*, Ninth Edition, Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S. & Taylor D.J., eds, Blackwell Science, Oxford, UK, 419–433.
- PENSAERT M., GIELKENS A.L., LOMNICZI B., KIMMAN T.G., VANNIER P. & ELOIT M. (1992). Round table on control of Aujeszky's disease and vaccine development based on molecular biology. *Vet. Microbiol.*, **33** (1–4), 53–67. Review.
- PENSAERT M., LABARQUE G., FAVOREEL H. & NAUWYNCK H. (2004). Aujeszky's disease vaccination and differentiation of vaccinated from infected pigs. *Dev. Biol. (Basel)*, **119**, 243–254.
- QUINT W., GIELKENS A., VAN OIRSCHOT J., BERNS A. & CUYPERS H.T. (1987). Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of 'live' vaccines. *J. Gen. Virol.*, **68**, 523–534.
- SCHOENBAUM M.A., BERAN G.W. & MURPHY D.P. (1990). A study comparing the immunologic responses of swine to pseudorabies viral antigens based on the ELISA, serum virus neutralization, and latex agglutination tests. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2** (1), 29–34.
- STELLMANN C., VANNIER P., CHAPPUIS G., BRUN A., DAUVERGNE M., FARGEAUD D., BUGAUD M. & COLSON X. (1989). The potency testing of pseudorabies vaccines in pigs. A proposal for a quantitative criterion and a minimum requirement. *J. Biol. Stand.*, **17**, 17–27.
- TOMA B. & ELOIT M. (1986). Pseudorabies virus antibodies (Aujeszky's disease). *In: Methods of Enzymatic Analysis X, Antigens and Antibodies 1*, Bergmeyer V.C.H., ed. D-6940 Weinheim, Germany
- TOMA B., ELOIT M. & TILMANT P. (1986). Sérodiagnostic de la maladie d'Aujeszky: utilisation de prélèvements de sang sur papier filtre. *Rec. Med. Vet.*, **162**, 1111–1117.
- VAN OIRSCHOT J.T., RZIHA M.J., MOONEN, P.J.L.M., POL J.M. & VAN ZAANE D. (1986). Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive immunoassay. *J. Gen. Virol.*, **67**, 1179–1182.
- VAN OIRSCHOT J.T., TERPSTRA C., MOORMANN R.J.M., BERNS A.J.M. & GIELKENS A.L.J. (1990). Safety of an Aujeszky's disease vaccine based on deletion mutant strain 783 which does not express thymidine kinase and glycoprotein I. *Vet. Rec.*, **127**, 443–446

VAN RIJN P.A., WELLENBERG G.J., HAKZE-VAN DER HONING R., JACOBS L., MOONEN P.L. & FEITSMA H. (2004). Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative real time PCR technology. *J Virol. Methods*, **120** (2), 151–160.

VANNIER P. (1986). Immunisation de porcs charcutiers contre la maladie d'Aujeszky avec deux vaccins à adjuvants huileux. Etude des réactions locales. *Rec. Med. Vet.*, **162**, 37–44.

VANNIER P., CAPUA I., LE POTIER M.F., MACKAY D.K., MUYLKENS B., PARIDA S., PATON D.J. & THIRY E. (2007). Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures. *Rev. Sci. Tech.*; **6** (2), 351–372.

VANNIER P., HUTET E., BOURGUEIL E. & CARIOLET R. (1991). Level of virulent virus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines. *Vet. Microbiol.*, **29**, 213–223.

VISSER N. & LUTTICKEN D. (1988). Experiences with a gI-/TK-modified live pseudorabies virus vaccine: strain Begonia. *In: Vaccination and Control of Aujeszky's Disease*, Van Oirschot J.T., ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 37–44.

YONG T., HUAN-CHUN C., SHAO-BO X, YA-LI Q., QI-GAI H. & YU-QI R. (2005). Development of a latex agglutination test using the major epitope domain of glycoprotein E of pseudorabies virus expressed in *E. coli* to differentiate between immune responses in pigs naturally infected or vaccinated with pseudorabies virus. *Vet. Res. Commun.*, **29** (6), 487–497.

YOON H.-A., EO S.-K., ALEYAS A.G., CHA S.-Y., LEE J.-H., CHAE J.-S., JANG H.-K., CHO J.-G. & SONG H.-J. (2006). Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. *J. Vet Med. Sci.*, **68**(2), 143–148.

*

* *

NB: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по болезни Ауески (смотри таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или самый последний актуализированный список на веб-сайте МЭБ:

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

Свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения любой дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против болезни Ауески.