

ГЛАВА 3.4.7.

ВИРУСНАЯ ДИАРЕЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

РЕЗЮМЕ

Крупный рогатый скот в любом возрасте восприимчив к инфекции вирусом вирусной диареи крупного рогатого скота (ВВД КРС). Вирус распространен по всему миру, однако некоторые страны недавно искоренили вирус. В результате инфицирования вирусом вирусной диареи КРС наблюдается широкий диапазон клинических проявлений, включающих энтеральные и респираторные болезни у любого класса КРС или репродуктивные или фетальные болезни после инфицирования восприимчивых племенных самок. Инфекция может носить субклиническую форму или развиваться в серьезную смертельную болезнь. Животные, выжившие в результате внутриутробного инфицирования в первом триместре беременности почти всегда являются персистентно инфицированными (ПИ). Персистентно инфицированные животные представляют основной резервуар вируса в популяции и выделяют большое количество вируса с мочой, фекалиями, выделениями, молоком и спермой. Идентификация таких персистентно инфицированных животных является ключевым элементом в контроле инфекции. Важно не допускать торговлю такими животными. Они могут выглядеть клинически здоровыми или слабыми и болезненными. Многие персистентно инфицированные животные погибают, не достигнув зрелости. У них часто развиваются вирусная диарея, сопровождающаяся потерей аппетита, поражениями желудочно-кишечного тракта и профузная диарея, неизменно ведущая к смерти. Вирусная диарея может возникнуть только у персистентно инфицированных животных. Обычно латентные инфекции после выздоровления после острой инфекции не наблюдаются. Однако у быков в редких случаях может наблюдаться тестикулярная инфекция и они могут выделять вирус со спермой в течение долгого периода времени.

Идентификация агента: ВД КРС – пестивирус семейства *Flaviviridae*. Он является близкородственным к вирусам классической чумы свиней и пограничной болезни овец. Два генотипа (тип 1 и 2) классифицированы как отдельные виды в роде Пестивирус. Третий предполагаемый генотип, ВВД КРС тип 3 был недавно предложен. Несмотря на то, что существуют как цитопатические, так и нецитопатические биотипы ВВД КРС типа 1 и типа 2, нецитопатические штаммы обычно встречаются в полевых инфекциях и являются основной целью при диагностическом выделении вируса в культурах клеток. Персистентно-инфицированные животные могут быть с легкостью идентифицированы посредством разнообразия методов, направленных на обнаружение вирусных антигенов или вирусной ДНК сразу в крови или тканях. Вирус может быть также выделен посредством инокуляции образцов в восприимчивые культуры клеток с последующим применением методов для обнаружения репликации вируса в тканях. Персистентность вирусной инфекции должна быть подтверждена посредством повторного отбора образцов после, по крайней мере, трехнедельного интервала, когда вирус будет снова обнаружен. Персистентно инфицированные животные обычно являются серонегативными. Виремия в острых случаях является неустойчивой и ее трудно обнаружить. Анализы по обнаружению РНК являются особенно полезными, благодаря быстрой их выполнения, высокой чувствительности и тому факту, что они не зависят от использования клеточных культур.

Серологические тесты: Лучшие всего подтверждать острую инфекцию вирусом ВД КРС посредством демонстрации сероконверсии с использованием последовательных парных образцов, отобранных от нескольких животных в группе. Тестирование парных

(отобранных во время острой фазы и у переболевших животных) образцов должно проводиться с интервалом, как минимум, 21 день и тестирование образцов должно проходить параллельно в том же самом анализе. В основном широко используются твердофазный иммуноферментный анализ и реакция вируснейтрализации.

Требования к вакцинам: Стандартной вакцины против ВД КРС не существует, но имеется ряд коммерческих препаратов. Идеальная вакцина должна быть способной предотвратить трансплацентное инфицирование у беременных коров. Модифицированная живая вирус-вакцина не должна применяться у беременных коров (или телят на подсосе) из-за риска трансплацентной инфекции. Живые вакцины, содержащие цитопатические штаммы ВВД КРС, представляют риск индуцирования вирусной диареи у персистентно инфицированных животных. Инактивированные вирусные вакцины являются безопасными и их можно применять у любых классов животных, но обычно требуется проведение бустерной вакцинации. ВВД КРС является особенно значительной угрозой из-за высокой частоты контаминации партий фетальной бычьей сыворотки, использующей в качестве культуральной среды.

А. ВВЕДЕНИЕ

1. Влияние болезни

КРС в любом возрасте восприимчив к инфицированию вирусами вирусной диареи КРС (ВВД КРС). Вирус распространен по всему миру, хотя в некоторых странах он был искоренен. В результате инфицирования вирусом вирусной диареи КРС наблюдается широкий диапазон клинических проявлений, включающих энтеральные и респираторные болезни у любого класса КРС или репродуктивные или фетальные болезни после инфицирования восприимчивых племенных самок. Инфекция может носить субклиническую форму или развиться в серьезную смертельную болезнь. Клинические признаки и серьезность заболевания могут быть разными в зависимости от различных штаммов вируса. Вирусы ВД КРС также приводят к подавлению иммунитета, что делает инфицированных животных более восприимчивыми к инфицированию другими вирусами или бактериями. Клиническое воздействие может быть более заметным у сельскохозяйственных животных, содержание которых осуществляется интенсивным методом. Животные, выжившие в результате внутриутробного инфицирования в первом триместре беременности, почти всегда являются персистентно инфицированными (ПИ). Персистентно инфицированные животные представляют основной резервуар вируса в популяции и выделяют большое количество вируса с мочой, фекалиями, выделениями, молоком и спермой. Вирус распространяется в основном в результате тесного контакта персистентно инфицированных животных с другими животными. Выделение вируса животными, инфицированными в острой фазе, обычно является менее важным. Вирус может также сохраняться в окружающей среде в течение коротких периодов времени или может передаваться с контаминированными репродуктивными материалами. Вертикальная передача играет важную роль в его эпизоотологии и патогенезе.

Инфицирование племенных самок может привести к неудачному оплодотворению или эмбриональным и фетальным инфекциям, в результате чего могут иметь место аборт, мертворождение, тератогенные отклонения или рождение персистентно инфицированных телят. Персистентно вирусемические животные могут рождаться слабыми, болезненными или могут быть здоровыми и в течение долгого периода времени клинические признаки могут быть не распознаны. Однако у персистентно инфицированных животных продолжительность жизни значительно меньше и до наступления взрослого возраста высокий процент животных умирает. В нечастых случаях у некоторых животных могут в дальнейшем развиться потеря аппетита, поражения желудочно-кишечного тракта и профузная диарея, неизменно ведущая к смерти. Вирусная диарея может возникнуть

только у персистентно инфицированных животных. Необходимо не допускать торговлю вирусными животными. В основном считается, что серологически положительные, не вирусные животные «безопасны», при условии, что они не являются беременными. Однако небольшой процент персистентно вирусных животных может производить антитела к некоторым вирусным белкам, если они подвержены контакту с другим штаммом ВВД КРС, который является антигенно отличным от персистирующего вируса. Впоследствии серопозитивность нельзя полностью приравнивать к «безопасности». Обнаружение персистентно инфицированных животных необходимо специально направлять на обнаружение вируса и его компонентов (РНК или антигенов). Латентные инфекции обычно не наблюдаются после выздоровления от острой формы болезни. Однако в сперме, отобранной от быков во время острой формы болезни, вероятно, содержится вирус во время вирусного периода и часто в течение короткого промежутка времени после. Хотя довольно редко у некоторых выздоровевших быков может наблюдаться персистирующая тестикулярная инфекция и они могут выделять вирус со спермой, возможно, в течение неопределенного периода времени.

Тогда как штаммы ВВД КРС являются в основном патогенными организмами КРС, межвидовая передача может наблюдаться после близкого контакта с овцами, козами или свиньями. Инфицирование беременных представителей мелких жвачных или свиней ВВД КРС может привести к репродуктивным потерям или рождению персистентно инфицированных животных. Инфицирование ВВД КРС было зарегистрировано у верблюдовых как в Старом, так и в Новом Свете. Кроме того, штаммы вируса пограничной болезни инфицировали КРС, в результате чего наблюдались клинические признаки, которые невозможно отличить от инфекции ВВД КРС. Также было описано рождение КРС персистентно инфицированного пограничной болезнью КРС и последующее развитие вирусной диареи. Тогда как ВВД КРС и пограничная болезнь КРС были зарегистрированы как естественные инфекции у свиней, соответствующий вирус классической чумы свиней не инфицирует жвачных естественным способом.

Несмотря на то, что вирус распространен повсеместно, его контроль может быть достигнут на уровне стада, и даже на национальном уровне, как показал успешный процесс искоренения во многих европейских странах (Moening *et al.*, 2005).

2. Возбудитель

Вирус вирусной диареи КРС является вирусом с одноцепочной, линейной, положительно-полярной нитью РНК в роде *Pestivirus*, семейства *Flaviviridae*. Данный род содержит некоторое количество видов, включая два генотипа вирусной диареи КРС (типы 1 и 2) и близкородственные вирусы классической чумы свиней и пограничной болезни овечьих. Вирусы в данных генотипах демонстрируют значительное антигенное различие и в видах типа 1 и типа 2 изоляты ВВД КРС демонстрируют значительное биологическое и антигенное разнообразие. В двух генотипах ВВД КРС следующее разделение можно распознать посредством генетического анализа (Vilcek *et al.*, 2001). Два генотипа можно дифференцировать друг от друга и от других пестивирусов посредством моноклональных антител, направленных на основные гликопротеины E2 и E_{NS} или посредством генетического анализа. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) позволяет типировать вирусы прямо из образцов крови (Letellier & Kerhofs, 2003; McGoldrick *et al.*; 1999). Вирусы типа 1 наиболее распространены, хотя превалентность штаммов типа 2 может быть высокой в Северной Америке. ВВД КРС обоих генотипов может возникать в нецитопатических и цитопатических формах (биотипы), и классифицируется в соответствии с тем, индуцируется ли микроскопически заметная цитопатология во время инфицирования клеточных культур или нет. Обычно в популяциях КРС свободно циркулирует нецитопатический биотип. Нецитопатические

штаммы часто ответственны за болезнь у КРС и ассоциируются с энтеральной и респираторной болезнью у любого класса КРС или репродуктивной и фетальной болезнью после инфицирования восприимчивых племенных самок. Инфекция может иметь субклиническую форму или прогрессировать до серьезной смертельной болезни (Brownlie, 1985). Цитопатические вирусы встречаются в случаях инфицирования болезнью слизистых, клинический синдром, который относительно не распространен и предполагает «супер-инфицирование» животного, которое является персистентно инфицированным нецитопатическим вирусом, близко родственным цитопатическим штаммом. Два вирусных биотипа, найденные в животном, инфицированном болезнью слизистых оболочек, обычно являются близко родственными, если не идентичными. Вирусы типа 2 обычно являются нецитопатическими и ассоциируются со вспышками серьезной острой инфекции и геморрагическим синдромом. Однако некоторые вирусы типа 2 ассоциируются с болезнью, которую нельзя отличить от болезни, которая наблюдалась в случае наиболее часто выделяемых вирусов типа 1. Далее некоторые изоляты типа 1 ассоциируются со вспышками особенно серьезной и смертельной болезни у взрослых КРС. Инфекции с легкими и невыраженными клиническими признаками после инфицирования не беременных животных обоими генотипами довольно распространены.

Повышается осведомленность об «атипичном» или «НоВи»-подобном пестивирусе – предположительно ВВД КРС, тип 3, у КРС, также ассоциированном с клинической болезнью (Bauermann *et al.*, 2013), но в настоящее время его распространение является неясным. Эти вирусы обнаруживают посредством пан-реактивных анализов таких как ОТ-ПЦР в реальном времени. Некоторые коммерческие ИФА для обнаружения антигенов (иммуноферментный анализ) продемонстрировали способность обнаруживать эти штаммы (Bauermann *et al.*, 2012); обычно выделение вируса и т.д. следует тем же принципам, что и принципы в отношении ВВД 1 и 2. Однако необходимо отметить, что методы ИФА для обнаружения антител различаются в своей способности обнаруживать антитела к ВВД 3 и вакцины, разработанные для защиты против ВВД 1 и 2. могут не обеспечить полной защитой против инфицирования этими новыми пестивирусами (Bauermann *et al.*, 2012; 2013).

3. Патогенез

3.1. Острые инфекции

Острые инфекции ВВД КРС встречаются более часто у молодых животных и могут протекать без проявления клинических признаков или могут быть ассоциированы с диареей (Baker, 1995), болезнью дыхательных путей и иногда внезапной смертью. Серьезность болезни может отличаться по штамму вируса и участию других патогенных организмов (Brownlie, 1990). В особенности вспышки острой формы болезни, сопровождаемой геморрагическими поражениями, тромбоцитопенией и высокой смертностью были спорадически зарегистрированы в некоторых странах (Baker, 1995; Bolin & Ridpath, 1992). В результате инфицирования вирусами типа 2 была изменена тромбоцитарная функция. Во время острых инфекций наблюдается быстрая виремия, которая длится в течение 7-10 дней и вирус можно обнаружить в выделениях из носа и глаз. Также может наблюдаться временная лейкопения, тромбоцитопения или температурная реакции, но эти проявления могут значительно отличаться в зависимости от животных. Инфицированные животные могут быть предрасположены к вторичным инфекциям, вызванным другими вирусами или бактериями. Несмотря на то, что ВВД КРС может вызвать первоначальное респираторное заболевание само по себе, иммуносупрессивное действие вируса усиливает воздействие

вируса. ВВД КРС является одним из главных патогенных организмов комплекса респираторных болезней КРС у откормочного КРС и в других системах интенсивного содержания, таких как объекты по выращиванию скота.

Инфицирование племенных самок сразу перед овуляцией и в первые несколько дней после осеменения может привести к нарушениям зачатия и ранней потере эмбрионов (McGowan & Kirkland, 1995). Коровы могут также страдать от бесплодия, ассоциированного с изменениями овариальной функций и секрециями гонадотропина и прогестерона (Fray *et al.*, 2002). Быки могут выделять вирус со спермой в течение короткого времени во время и непосредственно после инфекции и могут испытывать временное снижение фертильности. Несмотря на то, что уровень вируса в сперме в общем низкий, он может привести к сниженному проценту зачатия и быть потенциальным источником внедрения вируса в наивное стадо (McGowan & Kirkland, 1995).

3.2. Внутритрубные инфекции

Инфицирование племенных самок может привести к различным результатам, в зависимости от периода стельности, когда произошло инфицирование. Перед 25 днем стельности инфицирование оплодотворенного яйца приведет к смерти эмбриона-зародыша, хотя аборт можно отложить на значительное время (McGowan & Kirkland, 1995). Выживший плод является здоровым и неинфицированным. Однако инфицирование самок в возрасте от 30 до 90 дней несомненно приведет к инфицированию плода, и все выжившее потомство будет персистентно инфицировано или серонегативно. Инфицирование на поздних этапах и до 150 дня может привести к врожденным дефектам, включая гидроанэнцефалию, церебральную гипоплазию, нарушения зрения, скелетным нарушениям, таким как артрогрипоз и гипотрихоз. Также может наблюдаться отсталое развитие, возможно в результате гипофизарных нарушений. Фетальная инфекция может привести к абортам, мертворождению, или рождению слабых телят, которые могут умереть вскоре после рождения (Baker, 1995; Brownlie, 1990; Duffell & Karkness, 1985; Moenning & Liess, 1995). Некоторые персистентно инфицированные телята могут показаться здоровыми при рождении, но при их росте наблюдаются проблемы. В течение всей жизни они остаются персистентно инфицированными и обычно они серонегативные. Проявление фетального иммунного ответа и выработка антител происходят примерно на 90-120 день, при этом возрастает процент инфицированных телят, у которых наблюдаются обнаруживаемые антитела, в то время как процент, где может быть обнаружен вирус, быстро снижается. Инфекция плода КРС после 180 дня обычно приводит к рождению здорового сероположительного теленка.

3.3. Персистентные инфекции

Персистентно вирусемические животные являются непрерывным источником вируса для других животных и главным резервуаром ВВД КРС в популяции. В популяции, где не применяется серьезная программа по контролю ВВД, приблизительно 1-2% КРС персистентно инфицированы. Во время вспышек в интактном стаде или племенной группе, если контакт произошел в первом триместре беременности, очень высокий процент выживших телят будет персистентно инфицирован. Если персистентно инфицированное животное

умирает, то патогномонических поражений в результате ВВД КРС не наблюдается и патология усложнена вторичными инфекциями другими агентами. Некоторые персистентно инфицированные животные доживают до сексуальной зрелости и могут дать приплод, но их потомство всегда будет персистентно инфицировано. Животные, которых продают или используют для искусственного разведения, должны быть подвергнуты скринингу, для гарантии того, что они не являются персистентно инфицированными.

3.4. Болезнь слизистых оболочек

Персистентно вирусемические животные могут в последствии быть подвержены болезни слизистых оболочек (Brownlie et al, 1985). Однако такие случаи редки. Синдром был результатом инфекции персистентно инфицированного животного антигенно-подобным цитопатическим вирусом, которая может возникнуть посредством суперинфекции, рекомбинации между нецитопатическими биотипами или мутации персистентного биотипа (Brownlie, 1990). Обычно не требуется специфического подтверждения того, что персистентно инфицированное животное заболело болезнью слизистых, так как это в основном только научное любопытство и имеет небольшое практическое значение, в остальном животное является персистентно инфицированным ВВД КРС. Однако случаи болезни слизистых могут быть первым указанием на то, что в стаде присутствует инфекция ВВД КРС и необходимо провести более глубокое исследование и вмешательство.

3.5. Сперма и эмбрионы

У персистентно инфицированных быков сперма обычно имеет плохое качество и является высоко инфекционной. У них наблюдается сниженная фертильность (McGowan & Kirkland, 1995). Все быки, используемые для естественного или искусственного осеменения должны пройти скрининг на наличие как острой, так и персистирующей инфекции ВВД. Редкий случай, возможно, в результате острой инфекции во время периода полового созревания, может привести к персистирующей инфекции семенника и таким образом сероположительным быкам, которые периодически выделяют вирус со спермой (Voges et al., 1998). Это явление также наблюдалось после вакцинации аттенуированным вирусом (Givens et al., 2007). Коровы-доноры эмбрионов персистентно инфицированные ВВД КРС также представляют потенциальный источник инфекции, особенно из-за очень высоких концентраций ВВД КРС в утробной и вагинальной жидкости. В то время как ооциты без интактного вителлинового слоя были восприимчивы к инфекции *in vivo*, большинство ооцитов остаются неинфицированными ВВД КРС. Здоровое неинфицированное поколение так же было «спасено» от персистентно инфицированных животных посредством использования экстенсивного промывания эмбрионов и оплодотворения *in vitro*. Самки КРС, используемые в качестве получателей эмбрионов должны всегда подвергаться скринингу для подтверждения того, что они не являются персистентно инфицированными и в идеале являются серопозитивными или были вакцинированы, по крайней мере, за 4 недели перед первым использованием.

Биологические материалы, используемые для методов оплодотворения *in vitro* (бычья сыворотка, культуры клеток КРС) имеют высокий риск

контаминации и должны быть подвергнуты скринингу на ВВД КРС. Случаи очевидного заноса вируса через такие методы наглядно свидетельствовали о данном риске. Считается важным, что сыворотка, используемая в среде, должна быть свободной от контаминантов, как описано в Главе 1.1.9. Тестирование биологических материалов на стерильность и свобода от контаминации, с использованием методов, описанных в Разделе В.3.1. данной Главы.

4. Подходы к диагностике и отбору образцов

По сравнению с персистентно инфицированными животными остро инфицированные животные выделяют относительно низкие уровни вируса и в течение короткого промежутка времени (обычно 7-10 дней), но клинические признаки могут наблюдаться во время поздней стадии виремии, тем самым сокращая время на обнаружение вируса в дальнейшем. В случаях респираторной или энтеральной болезни образцы следует отбирать от определенного количества инфицированных животных, предпочтительнее отбирая недавно инфицированных животных. Из ноздрей и конъюнктивы животных, больных респираторной болезнью или из прямой кишки или фекалий, при наличии энтеральных признаков, необходимо отбирать смывы. Легкие и селезенку предпочтительно отбирать от павших животных. Вирусную РНК можно обнаружить при помощи ОТ-ПЦР и она имеет преимущество в том, что является высоко чувствительной и может обнаружить геном из неинфекционного вируса. Так как уровни вируса очень низкие, не всегда является целесообразным проводить выделение вируса пока нет необходимости давать характеристику задействованному штамму ВВД КРС. Серологическое тестирование, которое проводилось на парных сыворотках животных в острой стадии болезни и переболевших животных (отобранные, по крайней мере, на 21 день после отбора пробы в острой стадии болезни и от 8-10 животных) является целесообразным и дает высокую вероятность установления или исключения инфицирования ВВД КРС.

Подтверждение того, что аборт, мертворождения и перинатальная смерть вызваны ВВД КРС, часто очень трудно установить, так как между первоначальным инфицированием и смертью или удалением плода может быть длительная задержка. При отборе проб необходимо принять во внимание необходимость обнаружения либо компонентов вируса, либо антител. Для обнаружения вируса предпочтительнее отбирать легкие и селезенку, в то время как перикардальная и плевральная жидкости являются идеальными жидкостями для серологических исследований. Необходимо проверять желудок и новорожденных телят для подтверждения того, что сосание не имело место. В то время как в некоторых случаях вирус может быть выделен из тканей плода, необходимо уделить внимание обнаружению вирусного антигена посредством ИФА или РНК посредством ОТ-ПЦР в реальном времени. Что касается серологических исследований, как ИФА, так и реакция вируснейтрализации являются подходящими, хотя качество образца и бактериальная контаминация могут поставить под угрозу способность обнаруживать антитела при помощи реакции вируснейтрализации. Серологические исследования стельных самок, особенно проведенные на группе животных, представляют ценность, если их задача состоит в определении того, имело ли место инфицирование в группе в недавнее время. Высокий титр антител ($>1/1000$) в материнской сыворотке говорит о фетальной инфекции и предположительно возникает из-за того, что сама попадает под расширенное воздействие вируса из-за плода.

4.2. Персистирующие инфекции

В прошлом, при идентификации персистентно инфицированных животных в значительной степени опирались на использование выделения вируса на клеточных культурах. Однако анализы ИФА и ОТ ПЦР в реальном времени для обнаружения антигена, имеющие высокую чувствительность, широко используются для обнаружения вирусных антигенов или РНК как у живых, так у мертвых животных. Выделение вируса, направленное на обнаружение нецитопатического ВД КРС в крови, также используется, тогда как в некоторых странах вирус был идентифицирован посредством иммуногистохимии (ИНС). Образцы кожи были отобраны от живых животных, тогда как подходящим является большой диапазон тканей мертвых животных. Как выделение вируса, так и иммуногистохимия являются трудозатратными и дорогими, а так же сложными технически. Выделение вируса из крови может быть затруднено из-за наличия материнских антител к ВВД КРС у телят в возрасте менее 4-5 месяцев. У животных более старшего возраста с персистирующей вирусемической инфекцией могут присутствовать низкие уровни антител из-за их способности видоизменять серологическую специфичность к штаммам ВВД КРС (включая вакцины), антигенно отличающимся от персистирующего вируса (Brownlie, 1990). Пробы сборного молока или пробы молока от отдельной коровы использовались для мониторинга молочных стад на наличие персистентно инфицированных животных. Были использованы ИФА для обнаружения антигена, ПЦР в реальном времени и выделение вируса. Для подтверждения диагноза персистирующей инфекции необходимо провести повторное тестирование животных через интервал равный трем неделям посредством тестирования образцов крови на наличие вируса и на доказательства сероконверсии. Повторное тестирование образцов кожи необходимо проводить с осторожностью, так как было продемонстрировано, что в некоторых острых случаях вирусный антиген может сохраняться в коже в течение нескольких недель (Cornish *et al.*, 2005).

4.3. Болезнь слизистых

Для лабораторного подтверждения диагноза болезни слизистых необходимо выделить цитопатический вирус, хотя это не применялось в целях плановой диагностики. Данный биотип может быть иногда выделен из крови, но его всегда можно выделить из разнообразия других тканей, особенно селезенки, кишечника и пейеровой бляшки. Выделение вируса можно проводить на селезенке, которую легко отобрать и которая бывает редко токсичной для культуры клеток.

4.4. Репродуктивные материалы

Пробы от быков-доноров спермы нужно отбирать для тестирования на отсутствие инфекции ВВД КРС до отбора спермы в соответствии с Кодексом МЭБ по наземным животным. Необходимо подтвердить, что эти быки не являются персистентно инфицированными, у них нет острой инфекции и необходимо установить их серологический статус. Данное первоначальное тестирование необходимо выполнять на цельной крови или пробах сыворотки. Для определения того, что серопозитивный бык не имеет персистирующей тестикулярной инфекции (РТИ), образцы спермы должны быть отобраны три раза через интервал равный семи дням из-за возможности периодического выделения вируса низкого уровня, особенно во время ранних стадий инфицирования. Также существует необходимость представить несколько трубочек от каждого отбора или определенный объем свежей спермы. Особое внимание необходимо уделить соблюдению рекомендаций по транспортировке проб и лаборатория документирует

состояние образцов по прибытии в лабораторию. Дальнейшая информация по сбору, транспортировке и требованиям к тестированию представлена в последующих разделах.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1 Методы тестирования, доступные для диагностики вируса вирусной диареи КРС и их задача

Метод	Задача					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегии по искоренению	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя ¹						
Выделение вируса	+	+++	++	+++	-	-
Обнаружение антигена посредством ИФА	++	+++	+++	+++	+++	-
Цель						
Обнаружение антигена при помощи иммуногистохимии	-	-	-	++	-	-
Обнаружение нуклеиновой кислоты посредством ОТ-ПЦР в реальном времени	+++	+++	+++	+++	+++	-
Обнаружение иммунного ответа						
ИФА	++	++	+++	-	+++	+++
Вирус-нейтрализация	+	+++	++	-	+	+++

Разъяснение: +++= рекомендуемый метод; ++= подходящий метод; += может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность и другие факторы могут в значительной степени отграничить его применение; - = не подходит для данной задачи, n/a – не применяется.

¹ Рекомендуется применение комбинации методов идентификации возбудителя на том же клиническом образце.

Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные как категория +++ или ++ были подвергнуты формальной валидации, характер их рутинного использования и тот факт, что они широко использовались без двусмысленных результатов делают их приемлемыми для использования.

ИФА – иммуноферментный анализ; ИНС- иммуногистохимия; НА-нуклеиновая кислота; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция; ISH-*in-situ* гибридизация; VN- нейтрализация вируса.

1. Обнаружение возбудителя

Для предотвращения отправки как животных, так и производных от животных (особенно спермы и эмбрионов), инфицированных ВВД КРС, необходимо провести тестирование на наличие инфекционного вируса (выделение вируса), вирусных антигенов (ИФА для обнаружения антигена) или РНК (ОТ-ПЦР в реальном времени) в крови отправленного животного или донора идиоплазмы (сперма или эмбрион). Исключение составляют серопозитивные быки, когда необходимо тестировать сыворотку, а не быка-донора. Серология имеет значение только для определения того, что серонегативные животные не имеют острой инфекции или для установления серологического статуса быков-доноров. Из-за их различной чувствительности без предшествующей амплификации вируса, такие процедуры как иммуногистохимия или *in situ* гибридизация напрямую на тканевых культурах не считаются подходящими для сертификации относительно свободы от ВВД КРС в целях международной торговли. Для сравнения, иммуноокрашивание является важным компонентом выделения вируса в клеточной культуре для обнаружения наличия нецитопатических штаммов ВВД КРС, преобладающих в полевых инфекциях.

Все методы тестирования должны быть тщательно валидированы посредством тестирования известных неинфицированных или инфицированных популяций с вирусами с высоким и низким титром. Необходимо продемонстрировать методы, основанные на анализе связывания поликлональных или моноклональных антител (ИФА или иммуногистохимия), методе иммунной метки (выделение вируса) или методе распознавания нуклеиновой кислоты, для обнаружения полного диапазона антигенного и генетического разнообразия, обнаруженного среди вирусов вирусной диареи КРС. Существуют три назначенные референтные лаборатории МЭБ по ВВД КРС, которые могут помочь с предоставлением соответствующей информации (смотрите список в Части 4 Руководства по наземным животным); к референтным лабораториям по классической чуме свиней можно также обращаться за консультацией.

1.1. Выделение вируса

При выполнении в соответствии с высокими стандартами метод выделения вируса вирусной диареи КРС является очень надежным. Однако данный метод имеет очень строгие требования для обеспечения того, чтобы клеточные культуры и компоненты среды представляли систему, которая является очень чувствительной и присутствие как низких уровней антител специфичных к ВВД КРС, так и вируса, не оказывает на нее отрицательного воздействия. Выделение вируса имеет потенциал обнаружения инфекционного вируса, что накладывает определенные ограничения на качество образца. Далее, для определения низких уровней вируса, который может присутствовать в некоторых образцах, особенно спермы, может быть необходимо исследовать большие объемы образца, чем обычно. Некоторые из этих ограничений можно преодолеть посредством использования ИФА для обнаружения антигена с доказанной высокой аналитической чувствительностью или посредством использования ОТ-ПЦР в реальном времени.

Вирус можно выделить в нескольких бовиных клеточных культурах монослоя (например, почки, легкие, семенники или носовые раковины). В некоторых случаях подходят клетки овечьих). Первичные и вторичные культуры можно заморозить как клеточные суспензии в жидком азоте. Их можно исследовать в серии пассажей или их можно высеять на другие восприимчивые клетки и проверить на свободу от контаминантов и провести оценку их чувствительности в сравнении с разрешенной серией клеток перед плановым использованием. Такие проблемы можно сократить за счет использования перевиваемых клеточных линий, которые являются свободными от ВВД КРС, однако, их статус свободы от ВД КРС и восприимчивость необходимо регулярно контролировать. Перевиваемые клетки нужно использовать в рамках системы «посевной серии клеток», где они используются только в ограниченном диапазоне пассажей, внутри которого они продемонстрировали приемлемую чувствительность к инфицированию ВВД КРС. Хотя определенные перевиваемые клеточные линии считаются подходящими для использования для выделения ВВД КРС, между сериями клеток из разных источников может быть значительное разнообразие из-за различных историй пассажей, поэтому их соответствие должно быть подтверждено перед плановым использованием.

Нецитопатический ВВД КРС является распространенным контаминантом тканей КРС и клеточные культуры необходимо проверять на свободу от занесенного вируса посредством проведения регулярного тестирования. Клетки должны расти в доказанных компонентах среды культуры клеток и необходимо исследовать большую площадь клеток. Не допустимо проводить скрининг нескольких лунок 96-луночного планшета – исследование всех лунок 96-луночного планшета будет более убедительным доказательством свободы. Фетальная бовиная сыворотка, которую отбирают для использования в клеточной культуре, также должна быть свободна не только от вируса, но в равнозначной, а то и большей степени, от ВВД КРС нейтрализующего антитела. Термическая обработка (56° в течение 30-45 минут) является неадекватной для уничтожения ВВД КРС в контаминированной сыворотке; облучение дозой равной, по крайней мере, 25 килогрей (2,5 мрад) является более точным. Коммерческие серии фетальной бовиной сыворотки обычно демонстрируют положительные результаты тестирования при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени даже после того, как вирус был инактивирован посредством инактивации. Далее, большинство коммерчески отобранных серий фетальной бовиной сыворотки содержат антитела к пестивирусам, иногда на уровнях, которые являются едва обнаружимыми, но достаточными для ингибирования выделения вируса. Чтобы преодолеть это, сыворотку можно получать из вируса ВД КРС и животных доноров без антител и с уверенностью использовать. Тестирование доноров, как на вирус, так и на антитела проходит на отдельном животном. Хотя лошадиная сыворотка была заменена на бовиную фетальную сыворотку, очень часто она имеет плохие характеристики, способствующие росту клеток. Далее иногда наблюдалась перекрестная контаминация с фетальной бовиной сывороткой во время обработки, что сводило к нулю задачу получения продукта, свободного от вируса ВД КРС.

Лейкоцитарные клетки, цельная кровь, отмытые лейкоциты или сыворотка подходят для выделения вируса от живых животных. Материнское антитело может помешать в процесс выделения из сыворотки молодых телят.

Тканевые суспензии, полученные от животных при вскрытии, нужно готовить с использованием стандартных методов. Подтверждение того, что бык не является персистентно инфицированным ВВД КРС в основном без затруднений достигается посредством тестирования образцов крови. Однако персистирующие тестикулярные инфекции (РТИ) были обнаружены у некоторых быков, которые выздоровели от острой инфекции, больше не являются вирусемическими и теперь серопозитивны (Voges *et al.*, 1998). Вирус можно обнаружить в большинстве, но во всех коллекциях спермы от этих быков. Хотя это пока еще считается нераспространенным, чтобы исключить возможность наличия РТИ необходимо провести скрининг спермы от всех серопозитивных быков. Чтобы быть уверенным в том, что бык свободен от РТИ, серии спермы, отобранной в течение нескольких недель необходимо подвергнуть скринингу. После скрининга серии отобранной спермы дальнейшее тестирование спермы серопозитивного быка не гарантировано. Свежая сперма и иногда разбавленная сперма является цитотоксичной и должна быть разведена в культуральной среде. По этим причинам важно контролировать здоровье клеток посредством микроскопического исследования в интервалы во время инкубации. Эти проблемы можно преодолеть посредством использования ОТ-ПЦР в реальном времени, которая имеет много преимуществ по сравнению с методом выделения вируса, включая более высокую чувствительность и возможность завершения в течение нескольких часов, а не недель, что характерно для выделения вируса.

Существует много вариантов процедуры использования метода выделения вируса. Все они должны быть оптимизированы, чтобы обладать максимальной чувствительностью обнаружения стандартного вирусного препарата. Все биологические компоненты, используемые для клеточной культуры, должны быть подвергнуты скринингу и должны продемонстрировать отсутствие как ВВД КРС, так и антител к ВВД КРС. Клеточные культуры (как исходные, так и перевиваемые клеточные линии) нужно регулярно проверять для подтверждения того, что они сохраняют максимальную восприимчивость к инфицированию вирусом. В зависимости от типа образца и цели тестирования, метод выделения вируса, вероятно, требует проведения одного или более пассажей на клеточных культурах. В то время как персистентно инфицированных животных можно легко идентифицировать посредством скрининга крови или сыворотки в одном пассаже, сперму необходимо культивировать для трех пассажей на плановой основе, а биологические продукты, такие как фетальная бычья сыворотка - до пяти раз (первичная инокуляция плюс четыре пассажа). Используются традиционные методы выделения вируса с добавлением конечного этапа иммуно-окрашивания (иммунофлуоресценция или чаще окрашивание пероксидазой) для обнаружения роста нецитопатического вируса. Эти культуры в пробирках должны иметь съемное покрывное стекло, в то время как культуры в микропланшетах должны быть зафиксированы и помечены прямо в планшете. Примеры приведены ниже. В качестве альтернативы супернатант клеточной культуры от конечного пассажа может быть подвергнут скринингу посредством ОТ-ПЦР в реальном времени (Смотрите ниже).

1.1.1. Иммунопероксидазный метод в микропланшетах для массового скрининга для обнаружения вируса в образцах сыворотки (Meyling, 1984)

- i) 10-25 мкл образца сыворотки помещают в каждую из четырех лунок 96-луночного микропланшета для культивирования культур. Эту процедуру необходимо повторить для каждого образца. Включены известные положительные и отрицательные контроли
- ii) 100 мкл клеточной суспензии в соответствующей концентрации (обычно около 150000 клеток/мл) в среде без фетальной телячьей сыворотки добавляют во все лунки: *Примечание:* сам образец действует в качестве обогатителя для роста клеток. При тестировании образцов за исключением сыворотки, используйте среду с фетальной телячьей сывороткой, свободной от антител к пестивирусам жвачных.
- iii) Планшет инкубируют при температуре 37°C в течение четырех дней либо в 5% CO₂ атмосфере или планшет герметично закрывают.
- iv) Каждую лунку исследуют под микроскопом на наличие цитопатологии (цитопатическое действие или ЦПД) или признаков цитотоксичности.
- v) Культуры быстро замораживают при температуре приблизительно -80°C и 50 мкл культурального супернатанта пассируют в новые клеточные культуры, повторяя этапы 3.1.1.i-iv, указанные выше.
- vi) Клетки фиксируют и окрашивают с применением одного из двух методов:

Параформальдегид

- a) Добавьте 200 мкл 1/10 разведения раствора формальдегида (приблизительно 3% концентрацию) в планшет и оставьте при комнатной температуре на 10 минут.
- b) Затем содержание планшета сбрасывают и планшеты промывают.
- c) Промойте планшет 5 раз с использованием 0,05% Твин 20 в воде (может быть использована автоматическая мойка микропланшетов с низким давлением и регулированием скорости)
- d) В каждый планшет добавьте 50 μ l противовирусного антитела в соответствующем разведении (приготовленном в фосфатно-буферном растворе/ФБР, содержащем 1% желатина) и инкубируйте в течение 60-90 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- e) Промойте планшеты пять раз как в этапе c).
- f) Разведите соответствующую антисыворотку, конъюгированную пероксидазой, до оптимального разведения в 1% желатине/ФБР (например, кроличий

антимышиный иммуноглобулин, конъюгированный пероксидазой, когда противовирусное антитело является мышинным моноклональным антителом). Оптимальную концентрацию нужно определять для каждой партии конъюгата посредством титрования в шахматном порядке на референтных положительных и отрицательных контролях.

- g) В каждую лунку микропланшета добавьте 50 μ l разведенного конъюгата пероксидазы и инкубируйте в течение 90 минут при температуре 37°C во влажной камере.
- h) Промойте планшеты 5 раз, в соответствии с процедурой, изложенной в этапе с).
- i) «Подготовьте» планшет, добавив 3-амино-9-этил карбазол (АЕС) и оставьте на 30 минут при комнатной температуре, чтобы произошла реакция.
- j) Добавьте 100 μ l ФБР в каждую лунку и каждый планшет закройте крышкой.
- k) Исследуйте лунки под микроскопом, начиная с лунок с положительным и отрицательным контролями. В неинфицированных клетках (отрицательный контроль) не должно быть или должно быть минимальное окрашивание. Инфицированные (положительный контроль) клетки должны быть красно-коричневого цвета в цитоплазме.

Ацетон

- a) Планшет опустошают, осторожно перевернув его и споласкивают в ФБР.
- b) Клетки фиксируют следующим образом: планшет помещают в ванну с 20% ацетоном в ФБР, немедленно опустошают и затем переносят в свежую ванну с 20% ацетоном в ФБР на 10 минут. Содержимое планшета тщательно сливают и как можно большее количество жидкости удаляют посредством слива и промокания. Планшет тщательно сушат в течение, по крайней мере, трех часов при температуре 25-30°C (например, используя лучистое излучение от настольной лампы). NB: сушка является частью процесса фиксации.
- c) Зафиксированные клетки ополаскивают, добавляя ФБР во все лунки.
- d) Лунки осушают и во все лунки добавляют антитело ВД КРС (50 мкл) в предустановленном разведении в ФБР, содержащем 1% Твин 80 (ФСБТ) и 5% лошадиную сыворотку или 1% желатин. (Лошадиную сыворотку

или желатин можно добавлять для уменьшения неспецифического окрашивания).

- f) Инкубируйте при температуре 37°C в течение 15 минут.
- g) Вылейте содержание планшетов и промойте три раза в (ФСБТ).
- h) Осушите планшет и добавьте соответствующую анти-видовую сыворотку, конъюгированную с пероксидазой, в predetermined разведении в ФСБТ (50 мкл на лунку) в течение 15 минут при температуре 37°C.
- i) Опустошите планшеты и промойте три раза в ФСБТ.
- j) Ополосните планшет в дистиллированной воде. Всю жидкость удаляют из планшета промоканием.
- k) Добавьте свежесготовленный субстрат перекиси водорода с подходящим хромогеном, например, 3-амино-9-этил карбазол (АЕС). Можно приготовить альтернативный субстрат, состоящий из 9 мг диаминобензанилида тетрагидрохлорила и 6 мг тетрагидрата пербората натрия, растворенного в 15 мл ФБР. Хотя окрашивание не такое интенсивное, эти химические вещества имеют преимущество, т.к. их можно транспортировать на воздушных средствах.
- l) Планшет исследуют под микроскопом. Вирус-положительные клетки демонстрируют красно-коричневое окрашивание.

Могут использоваться альтернативные методы фиксации клеток и они включают использование высоких температур (Смотри Главу 2.8.3. Классическая чума свиней, Раздел В.2.2.1.viii). Сначала их необходимо валидировать чтобы убедиться, что способности обнаруживать вирусный антиген ничего не угрожает.

1.1.2. Метод пробирок для ткани или суспензий из лейкоцитарных пленок

N.B. Данный метод может быть адаптирован в 24-луночной пластмассовой чашке. Обратите внимание, что требуется минимум проведение 2 и предпочтительнее 3 пассажа (включая первоначальную инокуляцию).

- i) Образцы тканей измельчают и готовят 10% суспензию в культуральной среде. Затем ее центрифугируют для удаления осадка.
- ii) В тестовые культуры в пробирках с новыми конфлюэнтными или субконфлюэнтными монослоями восприимчивых бовинных клеток инокулируют 0,1 мл образца. Культуру оставляют для адсорбции на один час при температуре 37°C.

- iii) Культуру промывают 1мл среды; затем ее сливают и добавляют 1 мл культуральной поддерживающей среды.
- iv) Культуру инкубируют в течение 4-5 дней при 37°C и исследуют под микроскопом на наличие ЦПД или признаков цитотоксичности.
- v) Культуру нужно заморозить и оттаять для пассажей на клеточные культуры для проведения предпочтительно двух и более пассажей (включая культуру, инокулированную для окончательного иммуно-окрашивания). При окончательном пассаже после замораживания-оттаивания тканевую культуральную жидкость собирают и пассируют на микротитровальные планшеты для культивирования и окрашивания методом иммунопероксидазы (смотрите раздел В.3.1.1 выше) или посредством метода иммунофлуоресценции. Для проведения иммунофлуоресценции покровные стекла включены в пробирки и используются для поддержки культуральных сред. В конце периода культивирования покровные стекла удаляют, фиксируют в 100% ацетоне и окрашивают иммунофлуоресцентным конъюгатом к ВВД КРС. Покровные стекла исследуют под флуоресцентным микроскопом на наличие диффузии, цитоплазмических флуоресцентных характеристик пестивирuсов. В качестве альтернативы можно провести скрининг супернатанта культуры от последнего пассажа посредством ОТ-ПЦР в реальном времени (смотрите ниже).

1.1.3. Выделение вируса из спермы

Обычно образцы, используемые для исследования, это разбавленная сперма КРС или иногда свежая сперма. Образцы спермы должны транспортироваться в лабораторию в жидком азоте или на сухом льду. Образцы необходимо хранить в жидком азоте или при температуре ниже - 70°C (для длительного хранения) или 4°C (для кратковременного хранения в течение не более 1-2 дней). Лаборатория-получатель должна зарегистрировать условия, в которых были получены образцы. Свежая сперма обычно цитотоксична и ее необходимо предварительно разбавить (например, в 1/10 бовиной сыворотке, свободной от ВВД КРС) перед добавлением в клеточные культуры. Необходимо провести тестирование, по крайней мере, 0,1 мл свежей спермы, посредством трех пассажей в клеточной культуре. В разбавленной сперме можно обнаружить токсичность. Что касается разбавленной спермы необходимо провести приблизительную оценку, чтобы удостовериться в том, что 0,1 мл свежей спермы подвергается тестированию (например, 1,0 мл разбавленной спермы). Если наблюдается токсичность, может потребоваться тестирование проб, разбавленных несколько раз, для получения объема, эквивалентного 0,1 мл свежей спермы (например, 5×1 мл образца разбавленной

спермы, которая была разведена 1/5 для снижения токсичности). Предлагаемый метод состоит в следующем:

- i) Развести 200 мкл свежей спермы в 1,8 мл бовиной спермы, содержащей антибиотика. Это может быть та же сперма, которая использовалась для добавления к клеточной культуре и она должна быть свободной от антител к ВВД КРС.
- ii) Интенсивно перемешать и оставить на 30 минут при комнатной температуре.
- iii) Иннокулировать 1 мл спермы/смеси спермы в монослой восприимчивых клеток (смотрите метод выделения вируса из ткани выше) в пробирки для культуры клеток или шестилуночные планшеты для культивирования тканей.
- iv) Инкубировать культуры в течение 1 часа при температуре 37°C.
- v) Удалить смесь, промыть монослой несколько раз стабилизирующей средой и затем добавить стабилизирующую среду к культурам.
- vi) Включить отрицательные и положительные контроли ВВД КРС в тест. Особое внимание необходимо уделить тому, чтобы избежать случайной контаминации лунок положительным контролем, например, работая с положительным контролем в последнюю очередь.
- vii) Осуществлять наблюдение планшетов с использованием микроскопа для обеспечения свободы от контаминации и цитотоксичности. В результате инфицирования вирусом ВД КРС не должно наблюдаться цитопатологии, но другие вирусы, такие как BNV-1 могут быть выделены случайно.
- viii) Через 5-7 дней культуры замораживают при температуре ниже -70°C и оттаивают, очищают посредством центрифугирования и супернатант используется для инокуляции свежих монослоев.
- ix) В конце второго пассажа супернатант от замороженного-оттаявшего препарата нужно пассировать на культуры в подходящей системе для иммунопероксидазного окрашивания или другого метода обнаружения антигена или посредством ОТ-ПЦР в реальном времени через 5 дней культивирования. Это легко достигается в 96 луночных планшетах. Образец считается отрицательным, если нет доказательств наличия вирусного антигена или не обнаружена РНК ВВД КРС.

1.2. Обнаружение нуклеиновой кислоты

ОТ-ПЦР на традиционном геле в прошлом использовался для обнаружения вирусной РНК ВД КРС для диагностических целей. Мультиплексная ОТ-ПЦР использовалась для одновременной амплификации и типирования вируса из клеточной культуры или прямо из образцов крови. Однако, ОТ-ПЦР, основанная на геле имеет недостаток, который состоит в том, что она является трудозатратной, дорогой и при ее проведении возможна перекрестная контаминация. Эти проблемы значительно уменьшились после внедрения методов в реальном времени с использованием зондов, методов количественной ОТ-ПЦР. Тем не менее необходимо предпринять строгие меры предосторожности во избежание контаминации нуклеиновой кислоты в тест-системе и помещениях лаборатории, где работают с образцами и где их подготавливают (смотрите главу 1.1.6. *Принципы и методы валидации диагностических тестов для инфекционных болезней* и Главу 3.6.3. *Разработка и оптимизация тестов для обнаружения нуклеиновой кислоты*). Эти тесты имеют гораздо большую чувствительность, чем ОТ-ПЦР с использованием геля и могут быть завершены в течение нескольких часов. Они широко используются для диагностики инфекционных заболеваний, позволяя напрямую обнаружить вирусную РНК из широкого диапазона образцов, включая сыворотку, цельную кровь, ткани, молоко и сперму. Высокая аналитическая чувствительность позволяет принять стратегии для скрининга пулов отдельных образцов и проводить тестирование сборного молока. Посредством использования данного подхода можно идентифицировать наличие одного или нескольких персистентно инфицированных животных в стадах, содержащих несколько сотен коров. Несмотря на то, что ОТ-ПЦР является немного более дорогим методом, этот метод считается быстрым и надежным и может использоваться также для скрининга супернатанта из последнего пассажа культур клеток. Несмотря на то, что ОТ-ПЦР в реальном времени имеет высокую чувствительность и может применяться для скрининга биологических материалов, используемых для производства вакцин, необходимо внимательно интерпретировать результаты, так как обнаружение вирусной РНК само по себе не подразумевает, что присутствует инфекционный вирус. Методы ОТ-ПЦР в реальном времени основаны на зонды ДНК, меченые флуоресцином также может быть использован для дифференциации пестивирусов (e.g. McGoldrick *et al.*, 1999).

Праймеры для теста должны быть отобраны из высоко консервативных областей генома, в идеале 5'-некодирующей области, или NS3 (p80 гена). Существуют опубликованные тесты, которые являются широко реактивными в роде пестивирусов и обнаруживают все типы ВВД КРС, вирус КЧС и большинство атипичных пестивирусов (например, Hoffman *et al.*, 2006). Чувствительный высоко-реактивный тест рекомендуется для диагностики, так как иногда встречается межвидовая передача различных пестивирусов. Когда требуется дальнейшая идентификация специфического вируса, видоспецифичные тесты на пестивирусы могут применяться для дальнейшего типирования вирусов. Важно тщательно оптимизировать все аспекты ОТ-ПЦР в реальном времени, включая экстрагирование нуклеиновой кислоты и очистку. Необходимо определить оптимальные концентрации Mg^{2+} , праймеров, зонда и полимеразы и параметры цикла. Однако, полностью составленные и оптимизированные, готовые к использованию «мастермиксы» теперь доступны в продаже и требуют только добавления оптимизированных концентраций праймеров и зонда.

Для определенного мастермикса часто рекомендуют оптимизированные условия цикла.

Разнообразные коммерчески доступные системы очистки нуклеиновой кислоты имеются в форме наборов и некоторые могут быть полуавтоматическими. Системы, основанные на захвате и очищении РНК с использованием магнитных микроносителей, используются достаточно широко и позволяют осуществить быструю обработку большого количества образцов. Необходимо провести оценку специфичных продуктов для определения оптимального набора для определенного типа образцов и того, требуется ли предварительная обработка образцов. Для образцов цельной крови важен тип антикоагулянта и объем крови в пробирке с образцом. Больше проблем с ингибиторами реакции ПЦР наблюдается с образцами, собранными в кровь, обработанную гепарином, а не ЭДТА. Эти различия также усугубляются, если пробирка не содержит рекомендованный объем крови, таким образом, увеличивая концентрацию антикоагулянта в образце. Для идентификации возможных ложно-положительных результатов рекомендуется внести экзогенную матрицу РНК (внутренний контроль) в образец до экстрагирования РНК (Hoffman *et al.*, 2006). Посредством включения праймеров ПЦР и зонда специфичного для экзогенной последовательности можно контролировать как эффективность РНК экстрагирования, так и наличие любых ингибиторов ПЦР. Будучи ценным для всех типов проб, включение внутреннего контроля является особенно желательным. При использовании внутреннего контроля необходимо проведение комплексных испытаний для обеспечения того, что амплификация внутреннего контроля в ПЦР не конкурирует с диагностической ПЦР и таким образом понижает аналитическую чувствительность (смотри также главу 1.1.6).

Когда имеется подозрение, что проба может содержать вещества, которые негативно влияют как на эффективность экстрагирования РНК или ОТ-ПЦР в реальном времени, небольшое разведение пробы в физиологическом растворе, культуральной среде или буферном растворе (например, PBGS) обычно помогает решить проблему. Разведение образца спермы на $\frac{1}{4}$ и цельной некоагулированной крови на $\frac{1}{10}$ обычно достаточно. Так как у ОТ-ПЦР в реальном времени обычно очень высокая аналитическая чувствительность, разведение образца редко оказывает значительное влияние на способность теста обнаруживать вирусную РНК при ее наличии.

1.2.1. Полимеразная цепная реакция в реальном времени для обнаружения ВВД КРС в сперме

ОТ ПЦР в реальном времени является очень полезной для скрининга образцов спермы для подтверждения свободы от ВВД КРС и помимо скорости обычно дает отличные результаты по выделению вируса в клеточной культуре, особенно, когда присутствуют низкие уровни вируса, такие, которые можно обнаружить в персистентно инфицированных быках. В ОТ-ПЦР в реальном времени, описанном здесь, используют пару праймеров, специфичных к последовательности для амплификации целевого ДНК и олигонуклеотида 5'-нуклеазы для обнаружения амплифицированных продуктов. Олигонуклеотид – это единичный, специфичный к последовательности олигонуклеотид, меченый двумя разными флуорофорами. Праймеры и

зонды доступны в продаже и доступно несколько разных вариантов флуорофоров. Данный анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения пан-пестивирусов создан для обнаружения вирусного ДНК всех штаммов ВВД КРС 1 и ВВД КРС 2, а также вируса пограничной болезни овец (BDV), КЧС и большинства атипичных пестивирусов. Анализ выборочно амплифицирует последовательность из 208 пар оснований 5' нетранслируемой области (5' NTR) генома пестивируса. Информация о праймерах и зондах представлена в протоколе, указанном ниже.

- i) Подготовка проб, оборудования и реагентов
 - a) Образцы, используемые для исследования, это обычно разбавленная бовиная сперма или иногда свежая сперма. Если тестирование образцов осуществляется только с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени, приемлема их доставка в охлажденном виде, но они должны быть холодными, когда поступают в лабораторию. В ином случае, если холодовую цепь нельзя обеспечить или если проводится выделение вируса, образцы спермы должны быть транспортированы в лабораторию в жидком виде или на сухом льду. В лаборатории пробы нужно хранить в жидком азоте или при температуре ниже -70°C (для длительного хранения) или 4°C (для кратковременного хранения до 7 дней). Обратите внимание на тот факт, что образцы для выделения вируса нельзя хранить при температуре 4°C более 1-2 дней.
 - b) Из-за очень высокой аналитической чувствительности ОТ-ПЦР в реальном времени, могут быть использованы гораздо меньшие объемы спермы. Однако, по крайней мере, нужно обработать три соломинки (минимально 250мкл каждая) из каждой партии отобранной спермы. Сперму в трех соломинках нужно объединить в пул и тщательно смешать перед отбором образца для выделения нуклеиновой кислоты.
 - c) Для проведения анализа требуются система обнаружения ОТ-ПЦР в реальном времени и соответствующее программное обеспечение для анализа данных. Количество систем обнаружения ОТ-ПЦР можно приобрести у разных производителей. Другое оборудование, требуемое для теста включает микроцентрифугу, охлаждающий блок, микровортекс и микропипетки. Так как методы ОТ-ПЦР в реальном времени могут обнаружить очень маленькие количества целевых молекул нуклеиновой кислоты, необходимо предпринять соответствующие меры для предотвращения контаминации, включая специально предназначенные и физически сепарированные «чистые» зоны для приготовления реагента (где не работают с образцами и материалами, используемыми для ПЦР), специальные зоны для обработки проб и изолированную зону для термоциклера и соответствующего оборудования. В каждой зоне должны находиться специально предназначенные реактивы и оборудование. Более того можно проводить обработку только

одного образа параллельно, чтобы контролировать возможность контаминации низкого уровня. Источники контаминации могут включать передачу продукта из положительных образцов или, что более часто встречается, перекрестную контаминацию продуктами ПЦР, полученными при ранее осуществляемой работе.

d) Анализ ОТ-ПЦР в реальном времени включает две отдельные процедуры.

1) Во-первых, ВВД КРС выделяют из спермы, с использованием валидированного метода экстрагирования нуклеиновой кислоты. Рекомендуются системы, использующие магнитные микроносители для захвата и очистки нуклеиновой кислоты. Также предпочтительно, чтобы манипуляции с микроносителями осуществлялись с использованием полуавтоматической системы работы с магнитными частицами.

2) Вторая процедура – анализ ОТ-ПЦР экстрагированной матрицы РНК в системе ОТ-ПЦР в реальном времени.

ii) Экстрагирование РНК

РНК или цельную нуклеиновую кислоту экстрагируют из объединенного образца спермы (три соломинки, отобранные в то же время от одного и того же животного). Рекомендуется использовать коммерчески доступный набор для экстрагирования с использованием магнитных микроносителей. Однако предпочтительным является набор, который прошел оценку для обеспечения оптимального экстрагирования трудных образцов (сперма и цельная кровь). Некоторые системы и протоколы наборов в значительной степени очищены, поэтому нет необходимости удалять клетки из образца спермы. До экстрагирования нужно развести образец спермы, объединенный в пул, в фосфатно-буферном растворе с добавлением желатина или подобном буферном растворе, $\frac{1}{4}$. Завершите экстрагирование РНК, взяв 50 мкл разведенного, объединенного в пул образца и добавьте его в буфер для лизиса образца. Некоторые коммерческие наборы для экстрагирования могут потребовать использования большего объема. Также было обнаружено, что удовлетворительные результаты можно получить посредством добавления 25 мкл неразведенного объединенного в пул образца в буфер для лизиса образца. Завершите экстрагирование, следуя инструкции производителя набора.

iii) Процедура проведения ОТ-ПЦР в реальном времени

a) Реакционная смесь: Существует несколько коммерческих наборов ОТ-ПЦР в реальном времени для амплификации, которые можно приобрести в разных источниках и выбранные наборы должны быть сопоставимы с выбранной платформой для ОТ-ПЦР.

Требуемые праймеры и зонды могут быть синтезированы различными коммерческими компаниями. Референтная лаборатория МЭБ по ВВД КРС может предоставить информацию о подходящих поставщиках.

- b) Доставка и хранение реактивов: Реакционная смесь для ОТ-ПЦР в реальном времени обычно поступает готовой к использованию с концентрации 2×. Инструкции производителя необходимо соблюдать при использовании и хранении. Исходные рабочие растворы для праймеров и зонда готовят с использованием воды бенуклеазы в концентрации 20 мкМ и 3 мкМ, соответственно. Исходные растворы хранят при температуре - 20°C и раствор зонда нужно хранить в темном месте. Аликвоты одноразового и ограниченного использования можно приготовить для ограничения замораживания-оттаивания праймеров и зондов и продлить их срок хранения.

- c) Последовательности праймеров и зондов

Выбор праймеров и зондов описан Hoffman et al. (2006) и обобщен внизу.

Прямая: BVD 190-F 5'-GRA-GTC-GTC-ART-GGT-TCG-AC

Обратная: V326 5'-TCA-ACT-CCA-TGT-GCC-ATG-TAC

Зонд: TQ-pesti 5'-FAM-TGC-YAY-GTG-GAC-GAG-GGC-ATG-C-TAMRA-3'

- d) Приготовление реакционных смесей

Реакционные смеси для ПЦР готовят в отдельном помещении, которое изолировано от других помещений, где проводят ПЦР и работают с пробой. Для каждого теста ПЦР необходимо включить соответствующие контроли. Как минимум необходимо включить контроль без матрицы (NTC), соответствующий отрицательный контроль (NC), два положительных контроля (PC1, C2). Положительные и отрицательные контроли включены на всех этапах анализа, начиная с экстрагирования, тогда как контроль без матрицы добавляют после завершения экстрагирования. Амплификации ПЦР выполняют в объеме 25 мкл. Описанный протокол основан на использовании системы на основе 96 луночного микропланшета, но другие варианты с использованием микропробирок тоже возможны. Каждая лунка планшета ПЦР должна содержать 20 мкл реакционной смеси и 5 мкл образца:

125 мкл	2×RT буфер из коммерческого набора
1 мкл	ВД КРС 190-F прямой праймер (20 мкМ)
1 мкл	V326 Обратный праймер (20 мкМ)
1 мкл	TQ-pesti зонд (3 мкМ)
2 мкл	тРНК (40 нг/мкл)
1,5 мкл	вода
1 мкл	25×ферментная смесь
5 мкл	образец (или контроли NTC, NC, PC1, PC2)

е) Выбор контролей

NTC: Обычно состоит из тРНК в воде без нуклеазы, которую добавляют вместо образца, когда устанавливают реакцию ПЦР.

NC: На практике многие лаборатории используют фосфатно-буферный раствор с желатином или подобный буфер. В идеале контролями для тестирования образцов спермы должна быть отрицательная сперма от серо-негативных быков. Однако, как минимум, используемый анализ должен быть всесторонне валидирован с отрицательными и положительными результатами для подтверждения того, что он обеспечивает надежное экстрагирование и амплификацию с использованием спермы.

PCs: Существует два положительных контроля (PC1=умеренный – (Ct 29-32) и PC2=слабый (Ct 32-35)). В качестве положительного контроля предпочтительнее использовать положительную сыворотку от естественно инфицированных быков. Однако, вероятно, ее трудно получить. Также сперму от персистентно инфицированного быка не считают подходящей, потому что вирусная нагрузка обычно очень высокая, и она не даст надежных показателей любого умеренного снижения в экстрагировании или рабочих характеристиках анализа. Отрицательная сперма, с добавлением определенных количеств вируса ВД КРС может быть использована в качестве альтернативы. Если другие образцы используются в качестве рутинного PC, весь процесс экстрагирования и используемый анализ ПЦР, как минимум, должны быть валидированы с использованием положительной спермы от быков с РТИ или от быков в стадии острой инфекции. Если эти образцы недоступны и используются пробы с добавками с целью валидации, необходимо включить несколько проб с добавлением очень низкого уровня вируса. Включение экзогенного контроля с каждым исследуемым образцом на ежедневной основе значительно компенсирует неиспользование положительной спермы в качестве контроля и даст дополнительные преимущества благодаря мониторингу анализа, проведенного на каждом отдельном образце. Положительные контрольные образцы необходимо готовить с осторожностью во избежание перекрестной контаминации от расплодки вируса с высоким титром и их нужно готовить заранее и замораживать в концентрации «годен к использованию» и в идеале в объеме для одноразового использования.

f) Экстрагированные образцы добавляют к миксу для ПЦР в отдельном помещении. Контроли нужно добавлять в последнюю очередь, в следующем порядке: NTC, отрицательный контроль и затем два положительных контроля.

g) Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Планшет или пробирки для ПЦР помещают в систему обнаружения ПЦР в реальном времени в отдельном помещении, предназначенном для проведения ПЦР. Многие мастермиксы имеют универсальные условия для реакции, которые подходят разным анализам. Например, система обнаружения ПЦР запрограммирована проводить исследование следующим образом:

1×48°C 10 минут

1×95°C 10 минут

45×(95°C 15и секунд, 60°C 1 минута)

h) Анализ данных, полученных в результате ПЦР в реальном времени

Программное обеспечение обычно установлено на автоматическую корректировку результатов посредством введения поправки на любой фоновый сигнал, и пороговый уровень устанавливается обычно в соответствии с инструкциями производителя для программного обеспечения, используемого для проведения анализа. В данном случае пороговое значение установлено на 0,05.

i) Интерпретация результатов

a) Исследуемые контроли – все контроли должны давать ожидаемые результаты, положительные контроли PC1 и PC2 должны находиться в назначенном диапазоне и как отрицательный контроль NC, так и контроль без матрицы NTC не должны иметь значения Ct.

b) Исследуемые образцы

1) Положительный результат: любой образец, который показывает пороговую величину цикла (Ct) менее 40 считается положительным.

2) Отрицательный результат: Любой образец, который не показывает величину Ct, считается отрицательным. Однако перед тем, как сообщить об отрицательных результатах исследования необходимо проверить характеристики экзогенного внутреннего контроля и результаты должны находиться в рамках утвержденного диапазона для данного контроля (например, Ct величина – не более чем на 2-3 Ct единицы выше чем NTC).

1.3. Твердофазный иммуоферментный анализ для обнаружения антигена

Обнаружение антигена с использованием ИФА стало широко распространенным методом для обнаружения отдельных персистентно инфицированных животных. Эти анализы не предназначены для обнаружения животных, инфицированных в острой форме (однако время от времени это можно достигнуть). Важно, что эти анализы не предназначены для скрининга спермы или биологических материалов, используемых в анализах или производстве вакцины. Были опубликованы несколько методов ИФА для обнаружения антигена и в продаже имеется несколько наборов. Многие основаны на принципе сэндвич-ИФА с захватом антигена, связанного с твердой фазой и на детекторном антители, конъюгированном с сигнальной системой, например пероксидазой. Этапы амплификации, такие как использование биотина и стрептавидина в системе обнаружения иногда используются для повышения чувствительности анализа. Описаны как

моноклональные, так и поликлональные системы. Тест измеряет антиген ВД КРС (NS2-3 или E_{RNS}) в лизатах лейкоцитов периферийной крови; новое поколение методов ИФА с захватом антигена (ИФА с захватом E_{RNS}) способно обнаруживать антиген ВД КРС в крови и в плазме или образцах сыворотки. Наилучший метод дает чувствительность схожую с выделением вируса, может быть предпочтительным в тех редких случаях, когда персистирующая инфекция сопровождается серопозитивностью. Из-за переходной вiremии ИФА для обнаружения антигена менее полезен для обнаружения антигена при острых инфекциях ВД КРС.

ИФА для обнаружения NS2-3 может быть менее эффективным у телят, которые получали молозиво из-за присутствия материнских антител к ВВД КРС. ОТ-ПЦР в реальном времени является наиболее чувствительным методом обнаружения при данных обстоятельствах, но ИФА для обнаружения E_{RNS} показал себя как чувствительный и надежный тест, особенно при использовании на образцах биопсии кожи (выщип на ухе) (Cornish *et al.*, 2005).

1.4. Иммуногистохимия

Методы с использованием компонентов, меченых ферментами, являются полезными для обнаружения антигена ВВД КРС в срезах тканей, особенно в тех случаях, когда доступны подходящие моноклональные антитела (MAbs). Однако эти анализы не подходят для сертификации животных для международной торговли и их использование должно быть ограничено диагностическими исследованиями. Важно, чтобы используемые реактивы и процедуры были полностью валидированными и чтобы неспецифичная реактивность была устранена. Для персистентно инфицированного КРС может использоваться почти любая ткань, но имеется особенно успешный опыт использования лимфатических узлов, щитовидной железы, кожи, мозга, сычуга и плаценты. Биопсии кожи, такие как образцы выщипа уха, были полезны для диагностики *in vivo* персистентной инфекции ВД КРС.

2. Серологические тесты

Антитела к ВВД КРС могут быть обнаружены в сыворотке КРС стандартным методом вируснейтрализации или ИФА с использованием одного из опубликованных методов или коммерческих наборов (например, Edwards, 1990). Серология используется для идентификации уровней иммунитета популяции, для обнаружения персистентно инфицированных животных в стаде, для содействия расследованию болезней репродуктивной системы и возможного участия ВВД КРС и установления серологического статуса быков, используемых для отбора спермы и идентификации инфекции, которая имела место недавно. При помощи ИФА для обнаружения антигена в образцах сборного молока можно установить статус стада по ВД КРС, что является очень полезным (Niskannen, 1993). Высокий показатель ИФА (0,8 или более единиц абсорбции) в ревакцинированном стаде означает высокую вероятность того, что стадо было подвергнуто контакту с ВВД КРС в недавнем прошлом, вероятнее всего, из-за наличия одного или двух персистентно вiremических животных. Напротив, очень низкое отрицательное значение ($\leq 0,2$) показывает, что вероятнее всего персистентно вiremические животные отсутствуют. Однако значения ИФА не всегда являются надежным индикатором наличия персистентно инфицированных животных на ферме, ввиду разных систем содержания животных (Zimmer *et al.*, 2002), недавнего введения вакцины или наличия вирусного антигена в сборном молоке, что может помешать анализу на обнаружение антител. Определение статуса антител у небольшого молодого поголовья (9-18 месяцев) также использовалось в качестве индикатора недавней передачи ВВД КРС

в стаде (Ноче *et al.*, 1995), но данный метод так же зависит от степени контакта между различными группами животных в стаде и потенциального контакта с соседними стадами. Реакции вируснейтрализации более часто используются для выполнения регулярных задач (например, тестирование доноров спермы), тогда как ИФА (обычно в виде коммерческих наборов) обычно используется для диагностики. Независимо от того, проводится ИФА или реакция вируснейтрализации, в каждый тест необходимо включить положительную и отрицательную стандартную сыворотку. Она должна показать результаты в предустановленных пределах для того, чтобы тест, считался обоснованным. В реакции вируснейтрализации в каждый исследуемый образец нужно также включить «сывороточный контроль» для мониторинга токсичности образца.

2.1. Реакция нейтрализации вируса

Выбор штамма вируса для включения в реакцию нейтрализации вируса является очень важным. Не существует ни одного штамма, который был бы идеальным для всех условий, но на практике нужно выбирать тот штамм, который обнаруживает высокое соотношение серологических реакций в местной популяции КРС. Есть возможность, что низкие уровни антител к ВВД КРС типа 2 не смогут быть обнаружены с использованием реакции нейтрализации вируса, в которой используется штамм вируса 1го типа и наоборот (Fulton *et al.*, 1997). Важно использовать в тесте типы 1 и 2 ВВД КРС, и те только тот, который присутствует по предположению диагноста, так как это может привести к недостаточной информации по тесту. Большинство лабораторий используют для реакции нейтрализации вируса высоко цитопатические, адаптированные к лаборатории штаммы ВВД КРС, так как в этом случае результаты теста гораздо легче прочитать. Два широко-используемых цитопатических штамма – «Oregon C24V» и «NADL». Однако в настоящее время доступны методы иммунных меток, позволяющие без затруднений обнаружить рост или нейтрализовать нецитопатические штаммы, когда это является желательным, особенно для поддержания включения актуального для данной местности штамма вируса. Внизу представлен протокол реакции нейтрализации вируса с использованием микропланшета (Edwards, 1990).

2.1.1. Процедура тестирования

- i) Исследуемую сыворотку инактивируют при высокой температуре 56°C в течение 30 минут.
- ii) Начиная с 1/4 исходного разведения готовят серийные двукратные разведения тестовой сыворотки в 96-луночном микротитровальном планшете с плоским дном для клеточной культуры, используя среду клеточной культуры в качестве разбавителя. Для каждого образца используют три или четыре лунки в каждом разведении в зависимости от степени требуемой точности. В каждом разведении сыворотки оставляют одну лунку для каждого образца без вируса для контроля доказательств токсичности образца, которая может имитировать вирусную цитопатологию или мешать репликации вируса. Контрольные положительная и отрицательная сыворотки должны также быть включены в каждую партию тестов.
- iii) В каждую лунку добавляют равный объем (например 50 мкл) расплодки цитопатического штамма ВВД КРС, содержащего 100 ТЦД₅₀ (50%), дозу инфицирующую культуру тканей. Обратное титрование вирусной расплодки также проводится в нескольких свободных лунках для проверки иммуногенности вируса (приемлемые пределы 30-300 ТЦД₅₀).

- iv) Планшет инкубируют в течение 1 часа при температуре 37°C.
- v) Плашку с подходящими клетками (например, носовая раковина, бычий семенник) трипсинизируют и концентрацию клеток доводят до $1,5 \times 10^5$ /мл. 100 мкл клеточной суспензии добавляют в каждую лунку микротитровального планшета.
- vi) Планшет инкубируют в течение 4-5 дней при температуре 37°C либо в 5% атмосфере CO₂, либо в герметично закрытом планшете.
- vii) Лунки исследуют под микроскопом на ЦПД или фиксируют или окрашивают иммунопероксидазным окрашиванием с использованием соответствующего моноклонального антитела. Титр нейтрализации вируса для каждой сыворотки это разведение, при котором вирус нейтрализуется в 50% лунок. Это можно подсчитать при помощи методов Спирмена-Кербера и Рида Мюнха. Серонегативные животные продемонстрируют отсутствие нейтрализации в самом низком разведении (1/4), эквивалентном конечному разведению 1/8. Для точного сравнения титров антител и особенно для демонстрации значительных (больше четырехкратных) изменений в титре, образцы необходимо исследовать параллельно в том же тесте.

2.2. Твердофазный иммуоферментный анализ

Могут использоваться как непрямой, так и блокирующий метод. В продаже имеются коммерческие наборы. Подобно реакции нейтрализации вируса, методы ИФА, измененные с использованием антигена от одного генотипа ВД, не могут обнаружить антитело, индуцированное другим антителом. Тесты, таким образом, нужно выбирать по их способности обнаруживать антитело к спектру генотипов и штаммам, циркулирующим в стране, где проводится тест.

Главная трудность в постановке теста заключается в приготовлении вирусного антигена достаточной иммуногенности. Вирус можно вырастить в оптимальных условиях культивирования с использованием высоко перmissive клеток. Любая сыворотка, используемая в среде не должна ингибировать рост ВВД КРС. Оптимальное время для сбора урожая должно быть определено экспериментальным путем для определенной системы культивирования. Вирус может быть концентрирован и очищен посредством центрифугирования в градиенте плотности. В качестве альтернативы иммуногенный антиген можно приготовить посредством обработки указанных клеточных культур моющими средствами, такими как Nonidet P40, N-деcanoил-N-метилглюкамин (Mega 10), Triton X-100 или 1-октилбета-D-глюкопиранозид (OGP). Некоторые специалисты использовали зафиксированные, инфицированные целые клетки в качестве антигена. В будущем можно будет наблюдать повышенное использование искусственных антигенов, полученных в результате экспрессии специфичных вирусных генов в бактериальных или эукариотических системах. Такие системы должны быть валидированы посредством тестирования сыворотки, специфичной для широкого диапазона различных штаммов вируса. В будущем данная технология должна позволить производить серологические тесты в дополнение к субъединичным или маркерным вакцинам, таким образом, позволяя дифференцировать вакцинированный и естественно инфицированный КРС. Далее представлен краткий протокол непрямого ИФА (Edwards, 1990).

2.2.1. Процедура тестирования

- i) Культуры роллерного типа вторичных клеток телячьих семенников с высокой множественностью заражения (около одной) инокулируют штаммом ВВД КРС Oregon C24V, покрывают средой без сыворотки и инкубируют в течение 24 часов при температуре 37°C.
- ii) Клетки собирают и осаждают центрифугированием. Среду супернатанта выбрасывают. Осадок обрабатывают двумя объемами 2% OGP в ФБР в течение 15 минут при температуре 4°C и центрифугируют для удаления клеточного осадка. Антиген супернатанта хранят маленькими аликвотами при температуре -70°C или лиофилизируют. Неинфицированные клетки обрабатывают параллельно для получения контрольного антигена.
- iii) Антиген разводят до получения предустановленного разведения в 0,05 М бикарбонатного буфера, рН 9,6. Чередующиеся ряды микротитровального планшета для ИФА сенсibiliзируют вирусом и контрольными антигенами в течение ночи при температуре 4°C. Затем планшеты моют в ФБР 0,05 Твин 20 и Твин 80 (ФСБТ) перед использованием в тесте.
- iv) Тестовую сыворотку разводят 1/50 в разбавителе сыворотки (0,5 М NaCl; 0,01М фосфатного буфера; 0,05 % Твин 20; 0,01 М этилендиамин-тетрауксусной кислоты; 1% поливинилпирролидона, рН 7,2) и добавляют в лунки, сенсibiliзированные вирусом и контролем на один час при температуре 37°C. Затем планшеты промывают пять раз в ФСБТ.
- v) Конъюгат кроличьих антибoвиных IgG с пероксидазой добавляют в предустановленном разведении (в разбавителе сыворотки) на 1 час при температуре 37°C, затем планшеты еще раз моют в ФСБТ).
- vi) Добавляют подходящий ферментный субстрат, такой как перекись водорода/тетраметил бензидин. После появления окрашивания реакцию останавливают серной кислотой и абсорбцию читают с использованием ИФА ридера. Коэффициент, полученный с контрольным антигеном, вычитают из реакции теста, чтобы получить удельный коэффициент поглощения для каждой сыворотки.
- vii) Рекомендуется пересчитывать удельный коэффициент поглощения для образца: положительный коэффициент (или процентная положительность) делением удельного поглощения на значение удельного коэффициента поглощения в данном тесте стандартной положительной сыворотки, которая имеет удельный коэффициент поглощения равный 1,0. Данная процедура нормализации приводит к более стабильным и воспроизводимым результатам.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Обоснование

Вакцины против ВВД КРС используются в первую очередь для контроля болезни, хотя они могут давать преимущества при производстве, особенно КРС в интенсивных системах содержания, таких как откормочные

площадки. В некоторых странах, где предпринимаются действия по искоренению ВВД КРС персистентно инфицированных животных удаляют, а оставшийся КРС вакцинируют для поддержания высокого уровня инфицирования и предотвращения возникновения персистентно инфицированных животных. Проведение вакцинации для контроля инфекции ВВД КРС может быть трудным частично из-за антигенного разнообразия вируса и возникновения персистирующих инфекций, которые развиваются в результате фетальной инфекции. Продолжающееся сохранение вируса в природе в основном поддерживается персистентно инфицированными животными, которые являются результатом внутриутробной инфекции. Цель применения вакцины должна состоять в предотвращении системной вирусемии и попадания вируса в плаценту. Если это можно успешно достичь, то вероятно применение вакцины сможет предотвратить большой диапазон других клинических проявлений, включая репродуктивные, респираторные и кишечные болезни и иммуносупрессию с ее вторичными осложнениями. В различных странах имеется несколько вакцин. Традиционно вакцины против ВВД КРС делятся на два класса: модифицированные живые вирусвакцины и инактивированные вакцины. Были описаны экспериментальные рекомбинантные субъединичные вакцины, основанные на вирусном гликопротеине ВД КРС E2, экспрессированном баколовирусом или трансгенными растениями и ДНК вакцины против E2 ВВД КРС, но только незначительное количество имеется в продаже, если вообще имеется. Они предлагают дальнейшие перспективы для маркерных вакцин при использовании вместе с дополнительным серологическим тестом.

1.1. Характеристика профиля целевого продукта

Традиционно вакцины против вирусной диареи КРС делят на два класса: модифицированные вакцины и инактивированные вирусвакцины. Важное требование к обоим типам состоит в том, что они должны иметь способность допустить высокий уровень фетальной инфекции. Многие живые вакцины были основаны на цитопатическом штамме вируса, который, как считается, не может пересечь плаценту. Однако важно обеспечить, чтобы вакцинный вирус не был причиной фетальной инфекции. Вообще вакцинация племенных животных должна быть завершена до осеменения для обеспечения оптимальной защиты и предотвращения любого риска фетальной инфекции. Живые вирусвакцины могут также быть иммуносупрессивными и провоцировать другие инфекции. С другой стороны модифицированные живые вирусвакцины могут вводиться только в одной дозе. Использование живого продукта, содержащего цитопатический штамм ВВД КРС, может спровоцировать возникновение болезни слизистых оболочек посредством суперзаражения персистентно инфицированных животных. Должным образом составленные инактивированные вакцины довольно безопасны в использовании, но для получения удовлетворительных уровней иммунитета требуется проведение бустерной вакцинации, что очень неудобно. Протокол комбинированной вакцинации с использованием инактивированной, а затем живой вакцины, может снизить риск нежелательных реакций на живой штамм. Независимо от того, является ли вакцина живой или инактивированной, из-за склонности к антигенному разнообразию вакцина должна включать штаммы ВВД КРС, которые близко соответствуют вирусам, обнаруженным на территории, где они используются. Например, в странах, где обнаружены штаммы ВВД КРС

типа 2 важно, чтобы вакцина включала подходящий штамм типа 2. Для достижения оптимального уровня иммунитета против штаммов типа 1 должны быть включены антигены из доминирующих подтипов (например, 1a и 1b). Из-за потребности приспосабливать вакцины к наиболее часто встречающимся штаммам в стране или регионе, не является возможным создать банк вакцинных антигенов, которым можно было бы пользоваться на глобальном уровне. Руководство по производству ветеринарных вакцин дано в *Главе 1.1.8 Принципы производства ветеринарных вакцин*. Указание данные здесь и в *Главе 1.1.8*. общие по характеру и их можно дополнить государственными и региональными требованиями.

2. Общая информация о производстве и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

Считается, что для оптимальной эффективности должно наблюдаться близкое антигенное соответствие между вирусами, входящими в состав вакцины и вирусами, циркулирующими в целевой популяции. Штаммы ВВД КРС типа 2 должны быть включены по необходимости. Из-за региональных вариантов генотипов и подтипов ВВД КРС, многие вакцины содержат более одного штамма ВВД КРС для обеспечения приемлемой защиты. Хорошее понимание антигенных характеристик отдельных штаммов можно достичь за счет скрининга панелей моноклональных антител (Paton *et al.*, 1995).

2.1.1. Биологические характеристики исходного вакцинного вируса

Изоляты цитопатического вируса обычно смешиваются с нецитопатическим биотипом. Отделение и очистка двух биотипов от исходной смешанной культуры является важным для поддержания ожидаемых характеристик посевного вируса и зависит от нескольких циклов методов предельных разведений для нецитопатического вируса или выбора бляшек для цитопатического вируса. Чистота цитопатического вируса должна быть подтверждена, по крайней мере, одним дополнительным пассажем в предельном разведении. Когда изоляты были клонированы необходимо, подтвердить их идентичность и ключевые антигенные характеристики. Идентичность посевного вируса должна быть подтверждена секвенированием. В тех случаях, когда в вакцину включены многочисленные изоляты, каждый должен быть приготовлен отдельно.

Тогда как штаммы, отобранные для посевного вируса сохраняют желательные антигенные характеристики, они не должны демонстрировать признаки заболевания при вакцинации восприимчивых животных. Живые аттенуированные вакцины не должны быть трансмиссивными для невакцинированных контактирующих животных и они не должны быть способны инфицировать плод. В идеале посевной вирус, приготовленный для производства инактивированных вакцин должен вырасти до высокого титра для минимизации потребности концентрировать антигены и должно быть минимальное количество белка из клеточных культур, включенного в конечный продукт. Расплодки как для живых, так и для инактивированных вакцин нужно готовить в системе посевных материалов, включающей исходный вирус и рабочую расплодку, которые могут использоваться для производства таким образом, что количество пассажей может быть ограничено и антигенный дрейф минимизируется. Тогда как не существует абсолютных критериев для этих целей, можно сделать общее указание, что посевной вирус, используемый для производства не должен подвергаться пассажу больше 20 раз, чем исходный вирус и исходный вирус должен быть самого низкого пассажа от оригинального изолята, так как это практично.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних агентов)

Очень важно, чтобы все материалы, используемые для приготовления большого количества антигенов, были подвергнуты развернутому скринингу для обеспечения свободы от посторонних агентов. Они включают исходный посевной вирус и рабочий посевной вирус, клеточные культуры, и все добавки к среде, такие как бовиная сыворотка. Особенно важно обеспечить, чтобы любая используемая сыворотка от КРС была свободна от обоих занесенных вирусов ВД КРС всех генотипов и антител против штаммов ВВД КРС, так как низкие уровни как вируса, так и антител могут маскировать наличие другого. Материалы и вакцинные вирусы должны быть исследованы на стерильность и свободу от контаминации другими агентами, особенно вирусами, как описано в главе 1.1.8. и главе 1.1.9.

2.1.3. Валидация вакцинного штамма

Все вакцины должны пройти стандартные тесты на эффективность. Тесты должны включать, как минимум, демонстрацию реакции нейтрализующих антител после вакцинации, снижение выделения вируса после контрольного заражения у вакцинированного КРС и в идеале предотвращение виремии. Проведение тестов на эффективность вакцин против ВВД КРС посредством оценки клинических параметров у нестерельных животных может быть ограничено из-за трудности стабильного установления клинических признаков, но при их применении, необходимо контролировать такие параметры, как снижение ректальной температурной реакции и лейкопению. Хотя при использовании метода выделения вируса в клеточных культурах, может быть трудным стабильно демонстрировать низкие уровни виремии, ассоциированные с острой инфекцией, ПЦР в реальном времени можно считать альтернативным методом для установления уровней циркулирующего вируса.

Если вакцина подвергается основным исследованиям, эффективность вакцинации можно, наконец, измерить способностью предотвращать трансплацентную передачу. Если наблюдается существенное снижение и в идеале полное предотвращение фетального инфицирования, ожидается, что вакцина будет высокоэффективной в других ситуациях (например, профилактика респираторных болезней). Подходящая система контрольного заражения может применяться с использованием интраназального введения нецитопатического вируса стельным коровам между 60м и 90м днем стельности (Brownlie *et al.*, 1995). Обычно в результате этой системы будет произведено персистентно инфицированное потомство неиммунизированных коров. В странах, где обычно встречаются вирусы ВВД КРС необходимо измерять эффективность защиты против инфицирования вирусом ВВВ КРС типа 2.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Как цитопатические, так и нецитопатические биотипы будут расти в разных клеточных культурах бовино происхождения. Могут использоваться стандартные процедуры, сбор урожая нецитопатического вируса предполагается на 4-7 день и цитопатического вируса на 2-4 день. Оптимальный урожай инфекционного вируса будет зависеть от нескольких факторов, включая культуральную среду, используемый изолят и первоначальный коэффициент высева вируса. Эти фактора необходимо учитывать и кинетику репликации вируса необходимо исследовать для установления оптимальных условий для крупномасштабного производства

вируса. Независимо от того, является ли вакцина живой или инактивированной важная цель состоит в производстве расплодки вируса с высоким титром. Этот балк-продукт антигена может впоследствии быть приготовлен в соответствии с рассматриваемым типом вакцины.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Наибольшее количество вакцин против ВВД КРС выращивают в культурах клеток от КРС, в которые часто добавляют компоненты среды животного происхождения. Материалом, представляющим особое беспокойство, является бовиная сыворотка из-за потенциала контаминации вирусами ВД КРС и антителами к этим вирусам. Эти занесенные контаминанты не только влияют на эффективность производства, но могут замаскировать наличие низких уровней инфекционного ВВД КРС, которые могут иметь нежелательные характеристики. Кроме того, вирусные инокуляты нужно тестировать на стерильность и свободу от контаминации другими агентами, особенно вирусами, в соответствии с главой 1.1.8 и 1.1.9. Далее материалы от КРС, а также овец и коз, должны происходить из страны с незначительным риском трансмиссивной губкообразной энцефалопатии КРС (ТГЭ) (смотри Главу 1.1.9).

2.2.3. Внутренний контроль

Внутренний контроль является частью производственного процесса. Культуры необходимо регулярно проверять для гарантии того, чтобы они оставались свободными от контаминации и для мониторинга здоровья клеток и развития или отсутствия ЦПЭ, если необходимо. Тогда как основным требованием для эффективности является способность индуцировать приемлемый ответ нейтрализующих антител, во время производства, целевые концентрации антигена, требуемые для получения приемлемого ответа можно контролировать косвенным образом, посредством оценки количества инфекционного вируса или производимой массы антигена. Для инактивированных вакцин инфекционность оценивают перед инаktivацией. Для инактивированных вакцин кинетика инаktivации должна быть установлена таким образом, чтобы можно было определить и включить в регулярные процессы производства подходящие пределы безопасности. В конце производства нужно проводить анализы клеточных культур *in vitro* для подтверждения полноты инаktivации. Эти тесты на безопасность должны включать достаточное количество пассажей и объем инокулята для обеспечения обнаружения низких уровней инфекционного вируса при его наличии.

2.2.4. Тесты партии готового продукта

i) Стерильность

Информацию по тестированию биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно прочитать в Главе 1.1.9.

ii) Идентичность

Тесты на идентичность должны демонстрировать отсутствие другого штамма ВВД КРС когда осуществляется размножение нескольких штаммов в помещениях по производству поливалентных вакцин.

iii **Безопасность**

Тесты на безопасность должны состоять из обнаружения любых необычных местных или системных реакций на вакцину, введенную различными способами. Требуется проведение тестов на безопасность каждой партии, кроме тех случаев, когда безопасность продукта продемонстрирована и УТВЕРЖДЕНА в регистрационном досье и производство осуществляется в соответствии с главой 1.1.8.

Тест на безопасность отличается от теста на безвредность (смотри выше).

iv) **Иммуногенность партии**

Вакцины против ВВД КРС должны продемонстрировать, что они продуцируют адекватные иммунные ответы при использовании в окончательном составе в соответствии с опубликованными инструкциями производителя. Необходимо определить минимальное количество инфекционного вируса и/или антигена, требуемого для продуцирования приемлемого иммунного ответа. Анализы *in-vitro* должны использоваться для контроля отдельных партий во время производства.

2.3. Требования к авторизации/регистрации/лицензированию

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины необходимо предоставить в соответствующие органы всю необходимую информацию о производителе вакцины и тестировании для контроля качества. Если иначе не оговорено органами, то информация должна быть предоставлена по трем последовательным партиям вакцины, объемом не менее 1/3 типичного объема производственной партии.

Не существует стандартного метода производства вакцин против ВД КРС, но можно использовать традиционные лабораторные методы с использованием стационарных, роллерных и суспензионных (микроносители) клеточных культур. Инактивированные вакцины можно изготавливать с применением традиционных методов, таких как инаktivация с использованием бинарного этиленмина или бета-пропиолактона (Park & Bolin, 1987). Можно использовать разнообразные адъюванты.

2.3.2. Требования к безопасности

Тесты *in-vivo* должны проводиться с использованием одной дозы, передозы (только для живых вакцин) и повторных доз (принимая во внимание максимальное количество доз для первоначальной вакцинации и, если необходимо, для первой ревакцинации/бустерной вакцинации) и содержат максимально разрешенную антигенную нагрузку и, в зависимости от состава вакцин, максимальное количество вакцинных штаммов.

i) **Безопасность целевых и нецелевых животных**

Безопасность конечного состава как живых, так и инактивированных вакцин должна оцениваться у восприимчивых молодых телят, свободных от материнских антител и у стельного КРС. Их нужно проверять на местные реакции после введения и, у стельного скота, на любое воздействие на не родившегося теленка. Живые аттенюированные вакцины могут повлиять на иммуносупрессию, которая может привести к повышению смертности. Они также могут содействовать развитию болезни слизистых у персистентно инфицированных животных, что является проблемой обеспечения благополучия. Таким образом, вакцинацию персистентно инфицированных животных живыми аттенюированными вакцинами, содержащими цитопатический вирус ВВД КРС, следует избегать. Живые аттенюированные вакцины не должны иметь способность передаваться другим невакцинированным животным, которые находятся в близком контакте.

- ii) Возврат к вирулентности для аттенюированных/живых вакцин и аспекты, касающиеся окружающей среды

Посевные вирусы, которые были подвергнуты пассивации, по крайней мере, в пределах или, что предпочтительно, сверх пределов пассивации, указанного для посевного вируса, должны быть инокулированы молодым телятам для подтверждения того, что нет доказательств наличия заболевания. Если живая аттенюированная вакцина была зарегистрирована для использования у стельных коров, тесты на возвращение к вирулентности должны также включать стельных коров. Живые аттенюированные вакцины не должны быть трансмиссивными для невакцинированных «контактирующих» животных.

- iii) Меры предосторожности (угрозы)

Считается, что ВВД КРС не представляет угрозу для здоровья человека. Стандартная надлежащая микробиологическая практика должна быть адекватной для работы с вирусом в лаборатории. Живая вирусная вакцина должна считаться безвредной для человека, при ее введении. Однако адъюванты, включенные как в живые, так и в инактивированные вакцины, могут причинить людям вред. Производители должны сделать адекватные предупреждения, что в случае самоинъекции необходимо обращаться за медицинской помощью (включая адъюванты, вакцины на основе масляной эмульсии, консерванты и т.д.). Предупреждения должны присутствовать на этикетке/инструкции к вакцине, чтобы специалист, осуществляющий вакцинацию осознавал данную опасность.

2.3.3. Требования к эффективности

Иммуногенность вакцины нужно определять посредством инокуляции в серонегативных телят и телят, у которых вирус отсутствует, с последующим мониторингом ответа антител.

Содержание антигена может быть исследовано с использованием ИФА и подкорректировано под стандартный уровень для определенной вакцины. Не существует стандартизированных протоколов анализа, применяемых для всех вакцин. Партии живых вакцин можно исследовать посредством титрации инфекционности. Каждая партия вакцины должна быть подвергнута тестам на иммуногенность и безопасность в качестве критерия для выпуска партии. Вакцины против ВД КРС должны продемонстрировать продуцирование адекватных иммунных ответов, как было описано выше, при использовании в последнем составе в соответствии с инструкциями производителя.

2.3.4. Вакцины, позволяющие применять стратегию DIVA (обнаружение инфекции у вакцинированных животных)

На сегодняшний день не существует коммерчески доступных вакцин против ВВД КРС, которые поддерживают использование стратегии DIVA. Были описаны экспериментальные субъединичные вакцины, основанные на вирусном гликопротеине E2 вирусной диареи КРС, экспрессированном бакуловирусом, но они не были доступны в продаже. Они предлагают дальнейшие перспективы «маркерных вакцин», при использовании вместе с дополнительным серологическим тестированием. Экспериментальные ДНК вакцины против E2 ВВД КРС и субъединичные вакцины против E2 ВВД КРС экспрессированы с использованием трансгенных растений и репликон альфавируса также был описан.

2.3.5. Длительность иммунитета

Существует мало публикаций по длительности выработки антител, после вакцинации с использованием коммерческого продукта. Протокол для их использования обычно рекомендуют первый курс, включающий две инокуляции и бустерную вакцинацию с годовыми интервалами. Доступны только ограниченные данные по уровням антител, которые коррелируют с защитой против респираторных инфекций (Bolin & Ridpath, 1995; Howard *et al.*, 1989) или инфекций *in-utero* (Brownlie *et al.*, 1995). Однако существует много коммерческих составов, и они включают адьюванты, которые могут поддерживать различные периоды эффективности. Следовательно данные по длительности иммунитета должны быть сформированы отдельно для каждого коммерчески доступного продукта посредством проведения контрольных тестов в конце периода заявленной длительности иммунитета.

2.3.6. Стабильность

Не существует общепринятых руководств в отношении стабильности вакцин против ВД КРС, но можно предположить, что аттенуированная вирус-вакцина (лиофилизированная) сохраняет иммуногенность в течение 1 года, при хранении при 4°C. Инактивированная вирус-вакцина может иметь более долгий срок хранения при 4°C. Более низкие температуры могут способствовать более длительному сроку хранения в отношении обоих типов, но адьюванты в убитых вакцинах могут препятствовать этому. Балк

антигены, которые не были включены в готовую вакцину, можно хранить в замороженном виде при низких температурах, но качество антигена необходимо контролировать с использованием анализов *in vitro* до включения в партию вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BAKER J.C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet. Clin. North. Am.* – Food Animal Practice, 11, 425–445.
- BAUERMANN F.V., FLORES E.F. & RIDPATH J.F. (2012). Antigenic relationships between bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* (official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians), 24, 253–261.
- BAUERMANN F.V., HARMON A., FLORES E.F., FALKENBERG S.M., REECY J.M. & RIDPATH J.F. (2013). *In vitro* neutralization of HoBi-like viruses by antibodies in serum of cattle immunized with inactivated or modified live vaccines of bovine viral diarrhea viruses 1 and 2. *Vet. Microbiol.*, 166, 242–245.
- BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1992). Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 53, 2157–2163.
- BOLIN S.R. & RIDPATH J.F. (1995). Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 56, 755–759.
- BROWNLIE J. (1985). Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. *In Practice*, 7, 195–202. BROWNLIE J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 43–59.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOOPER L.B. & BELL G.D. (1995). Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, 137, 58–62.
- CORNISH T.E., VAN OLPHEN A.L., CAVENDER J.L., EDWARDS J.M., JAEGER P.T., VIEYRA L.L., WOODARD L.F., MILLER D.R. & O'TOOLE D. (2005). Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17, 110–117.
- DUFFELL S.J. & HARKNESS J.W. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.*, 117, 240–245.
- EDWARDS S. (1990). The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 115–130.
- FRAY M.D., MANN G.E., BLEACH E.C.L., KNIGHT P.G., CLARKE M.C. & CHARLESTON B. (2002). Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, 123, 281–289.
- FULTON R.W., SALIKI J.T., BURGE L.J., DOFFAY J.M., BOLIN S.R., MAES R.K., BAKER J.C. & FREY M.L. (1997). Neutralizing antibodies to type-1 and type-2 bovine viral diarrhea viruses – detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 4, 380–383.

- GIVENS M.D., RIDDELL K.P., WALZ P.H., RHOADES J., HARLAND R., ZHANG Y., GALIK P.K., BRODERSEN B.W., COCHRAN A.M., BROCK K.V., CARSON R.L. & STRINGFELLOW D.A. (2007). Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine*, 25, 867–876.
- HOFFMANN B., DEPNER K., SCHIRRMIEIER H. & BEER M. (2006). A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J. Virol. Methods*, 136, 200–209.
- HOUE H., BAKER J.C., MAES R.K., RUEGG P.L. & LLOYD J.W. (1995). Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 327–332.
- HOWARD C.J., CLARKE M.C. & BROWNLIE J. (1989). Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet. Microbiol.*, 19, 195–203.
- LETELLIER C. & KERKHOF P. (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods*, 114, 21–27.
- MCGOLDRICK A., BENSUADE E., IBATA G., SHARP G. & PATON D. J. (1999). Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J. Virol. Methods*, 79, 85–95.
- MCGOWAN M.R. & KIRKLAND P.D. (1995). Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br. Vet. J.*, 151, 263–270.
- MEYLING A. (1984). Detection of BVD virus in viraemic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. In: *Recent Advances in Virus Diagnosis (CEC Seminar)*, McNulty M.S. & McFerran J.B., eds. Martinus Nijhoff, Belfast, UK, 37–46.
- MOENNIG V. & LIESS B. (1995). Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North. Am.*, 11, 477–487.
- MOENNIG V., HOUE H. & LINDBERG A. (2005). BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim. Health Res. Rev.*, 6, 63–74.
- NISKANEN R. (1993). Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.*, 133, 341–344.
- PARK B.K. & BOLIN S.R. (1987). Molecular changes of bovine viral diarrhoea virus polypeptides treated with binary ethylenimine, beta-propiolactone and formalin. *Res. Rep. Rural Dev. Admin. (L&V) Korea*, 29, 99–103.
- PATON D.J., SANDS J.J., LOWINGS J.P., SMITH J.E., IBATA G., EDWARDS S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, 26, 92–109.
- VILCEK S., PATON D.J., DURKOVIC B., STROJNY L., IBATA G., MOUSSA A., LOITSCH A., ROSSMANITH W., VEGA S., SCICLUNA M.T. & PALFI V. (2001). Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.*, 146, 99–115.

VOGES H., HORNER G.W., ROWE S. & WELLENBERG G.J. (1998). Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viremic bull. *Vet. Microbiol.*, 61, 165–175.

ZIMMER G., SCHOUSTRA W. & GRAAT E. A.M. (2002). Predictive values of serum and bulk milk sampling for the presence of persistently infected BVDV carriers in dairy herds. *Res. Vet. Sci.*, 72, 75–82.

*

* *

NB: Существуют референтные лаборатории МЭБ по вирусной диарее КРС

(смотри таблицу в части 4 данного Руководства по наземным животным или обратитесь к сайту МЭБ для получения более обновленного списка:

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

Пожалуйста, свяжитесь с референтными лабораториями МЭБ для получения дальнейшей информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам по вирусной диарее КРС