

КОЗЛЫ И БАРАНЫ

ГЛАВА 3.7.1.

ПОГРАНИЧНАЯ БОЛЕЗНЬ

РЕЗЮМЕ

Пограничная болезнь (ПБ) это вирусное заболевание овец и коз, впервые обнаруженное в 1959 году у овец в пограничном регионе Англии и Уэльса и с тех пор регистрируемое по всему миру. Распространенность данного заболевания среди овец варьирует от 5% до 50% для разных стран и регионов внутри стран. Клинические признаки включают низкую плодовитость, аборт, рождение мертвых или мелких, слабых ягнят. У заболевших ягнят могут наблюдаться тремор, отклонения от нормы в экстерьере и избыточный шерстный покров (так называемые «лохматые» ягнята), поэтому болезнь иногда называют 'hairy shaker disease' (от англ. «hairy» - «лохматый», «волосатый» и «shake» - «трястись»). Вертикальная передача играет важную роль в эпидемиологии этой болезни. Инфицирование плода может вести к появлению персистентно инфицированных (ПИ) ягнят. Такие ягнята вирусемичны, серонегативны и непрерывно выделяют вирус. Вирус передается от овцы к овце, причем персистентно инфицированные животные являются наиболее существенным источником инфекции. У коз инфекция менее распространена; основным признаком присутствия вируса являются аборты.

Возбудителем ПБ является вирус пограничной болезни (BDV), принадлежащий к роду Pestivirus, но в некоторых частях мира, особенно там, где имеет место тесный контакт между овцами или козами и крупным рогатым скотом, аналогичные клинические признаки могут появляться в результате заражения вирусом диареи крупного рогатого скота (BVDV). Таким образом, при изучении случаев вспышки болезни или при проведении сертификации животных или зародышевой плазмы для перемещения через границу следует принимать во внимание генетические и антигенные различия между BDV и BVDV. Важное значение имеет выявление вирусемичных, персистентно инфицированных животных во избежание их использования в качестве племенных животных или для целей торговли. Серологического исследования недостаточно. Однако считается, что невирусемичные овцы с положительным результатом серологического анализа являются «безопасными», поскольку случаи возникновения латентной инфекции у переболевших животных неизвестны.

Идентификация возбудителя: BDV это пестивирус семейства Flaviviridae. Он близкородственен вирусу классической чумы свиней и BVDV. Практически все изоляты BDV нецитопатогенны в клеточных культурах. Серотипы не определены, но изоляты вируса демонстрируют значительное антигенное разнообразие. Идентифицирован ряд отдельных генотипов.

Клинически здоровые персистентно инфицированные овцы могут быть выявлены путем прямого обнаружения вируса или нуклеиновой кислоты в крови или тканях или путем изоляции вируса в клеточной культуре с последующим иммуноокрашиванием для обнаружения нецитопатогенного вируса.

Методы диагностики: Методы обнаружения вируса путем изоляции в культуре и выявления антигенов могут быть менее надежными у ягнят в возрасте моложе 2 месяцев, получивших с молозивом колостральные антитела. Острая инфекция, как правило, протекает субклинически, вирусемия носит транзиторный характер и ее сложно установить. Изоляция вируса из тканей абортированных или мертворожденных ягнят часто затруднена, но вирус можно обнаружить при помощи высокочувствительных методов полимеразной цепной реакции, способных выявлять остаточную нуклеиновую кислоту. Однако ткани и кровь персистентно инфицированных овец в возрасте нескольких месяцев содержат высокие концентрации вируса, который легко идентифицировать изоляцией и прямыми методами обнаружения антигенов или нуклеиновых кислот. Поскольку овцы могут быть инфицированы BVDV, предпочтительно использовать диагностические методы, способные определять различные виды пестивирусов, и, следовательно, позволяющие обнаруживать все штаммы BDV и BVDV.

Серологический анализ: Наиболее надежным подтверждением наличия острой инфекции, вызванной BDV, является демонстрация сероконверсии с использованием парных или последовательных проб, взятых у нескольких особей группы. Иммуноферментный анализ и реакция нейтрализации вируса (РН) служат наиболее часто применяемыми методами обнаружения антител. Вследствие антигенных различий между BDV и BVDV,

в анализах на антитела к BDV, особенно в реакции нейтрализации вируса, предпочтительно использовать штамм BDV.

Требования к вакцинам: Стандартной вакцины для защиты от вируса пограничной болезни не существует, но производится коммерческая вакцина, содержащая неразрушенные убитые частицы вируса. В идеале, подобная вакцина должна быть пригодна для введения самкам перед случкой для предотвращения внутриутробного заражения плода. Находит поддержку идея использования вакцин против BVDV, но необходимо учитывать антигенное разнообразие вирусов ПБ.

Вирусы ПБ вызвали заражение нескольких модифицированных живых ветеринарных вакцин, произведенных на основе культур клеток овцы или содержащих овечью сыворотку. Производителям биологических препаратов следует принимать во внимание данную потенциальную опасность.

А. ВВЕДЕНИЕ

Вирус пограничной болезни (BDV) это вирус рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, близкородственный вирусу классической чумы свиней (CSFV) и вирусу диареи крупного рогатого скота (BVDV). Официально признано существование четырех видов, а именно, CSFV, BVDV типы 1 и 2, и BDV (ICTV, 2016), но сообщается о ряде других пестивирусов, расцениваемых в качестве отдельных видов. В то время как распространение CSFV ограничено, преимущественно, свиным поголовьем, представители трех других видов вирусов были обнаружены у овец. На территориях, где овцы и козы содержатся отдельно от других видов животных, большинство изолятов идентифицируется как вирус ПБ (Vilcek *et al.*, 1997). Но в регионах, где имеет место тесный контакт между представителями крупного и мелкого рогатого скота, часто можно обнаружить BVDV (Carlsson, 1991). Практически все изоляты BDV являются нецитопатогенными, хотя были выделены и единичные цитопатогенные вирусы (Vantsis *et al.*, 1976). В естественных условиях BDV распространяется среди овец ороназальным путем и посредством вертикальной передачи вируса. Вирус является, в первую очередь, причиной врожденных заболеваний у овец и коз, но может также вызывать острую и персистирующую инфекцию. Заболевание менее распространено среди коз, у которых персистирующая инфекция встречается редко, а основным признаком заболевания является аборт. Свины также подвержены заражению не только CSFV, но и другими пестивирусами, и антитела к BDV у свиней могут влиять на результаты тестов, проводимых с целью диагностики классической чумы свиней (Oguzoglu *et al.*, 2001). Описано несколько генотипов вирусов ПБ, найденных у овец, коз и пиренейской серны (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). Результаты филогенетического анализа с применением компьютерного анализа нуклеотидной последовательности позволяют предположить, что генетическая изменчивость среди вирусов ПБ выше, чем у других видов пестивирусов. Описаны четыре четко различимые геногруппы BDV, а также предполагаемые новые генотипы рода *Pestivirus*, найденные у тунисской овцы и козы (Becher *et al.*, 2003; Vilcek & Nettleton, 2006). Вирус ПБ, найденный у серны, аналогичен изолятам, полученным от овец, живущих на Пиренейском полуострове (Valdazo-Gonzalez *et al.*, 2007). Настоящая глава посвящена заболеванию, наблюдающемуся у овец. Родственные диагностические методы изложены также в главе 2.4.7 «Вирусная диарея крупного рогатого скота».

1. Острая инфекция

Здоровые новорожденные и взрослые овцы, подвергшиеся воздействию BDV, обычно переносят болезнь в легкой или бессимптомной форме. Небольшая лихорадка и слабо выраженная лейкопения связаны с непродолжительной вирусемией, которая определяется в период между 4 и 11 днями после заражения. Затем в сыворотке появляются нейтрализующие вирус антитела (Thabti *et al.*, 2002).

Острые инфекции наиболее эффективно диагностируются серологическими методами с использованием парных проб, взятых у репрезентативного числа овец. Единичные изоляты BDV могут вызывать сильную лихорадку, сильную и длительную лейкопению, анорексию, конъюнктивит, выделения из носа, одышку и диарею, а также 50%-ю смертность среди молодых ягнят. Один из таких изолятов был выделен в 1984 году в ходе тяжелой эпидемии ПБ среди молочных овец (Charpuis *et al.*, 1986). Другой подобный изолят являлся контаминантным BDV, обнаруженным в живой вакцине против классической чумы свиней (Wensvoort & Terpstra, 1988).

2. Внутриутробная инфекция

Основные клинические симптомы ПБ наблюдаются после инфицирования беременных овец. Первичная материнская инфекция носит субклинический или легкий характер, но для плода последствия заражения серьезны. Смерть плода может наступить на любой стадии беременности, но более часто это происходит в случае заражения на ранних стадиях развития плода. Небольшие мертвые плоды могут ресорбироваться, или же их абортация может пройти незамеченной, поскольку у овец сохраняется хороший аппетит, и они не выказывают признаков дискомфорта. По мере приближения времени окота наблюдаются выкидыши, мертворождение и преждевременные роды с появлением мелких, слабых ягнят. Получить подтверждение того, что аборт или мертворождение связаны с действием BDV, часто довольно сложно, но в некоторых случаях вирус может быть выделен из тканей плода. Более успешным может оказаться применение надлежащего протокола исследования методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР), преимуществами которого являются высокая чувствительность и способность обнаруживать геном неинфекционного вируса. Возможно также обнаружение вируса путем иммуногистохимического исследования материала мозга, щитовидной железы и других тканей недоношенных плодов (Thur *et al.*, 1997). Образцы плодной жидкости или сыворотки следует проверять на наличие антител к BDV.

Во время окота обнаруживается повышенное количество яловых овец, но основные клинические признаки, характерные для ПБ, отчетливее всего выражены у больных живых ягнят. Клинические симптомы, наблюдаемые у ягнят с ПБ, различаются в зависимости от породы овец, вирулентности вируса и момента занесения инфекции в стадо. Больные ягнята обычно мелкие и слабые, многие не могут самостоятельно стоять. Часто присутствуют признаки поражения нервной системы и изменения шерстного покрова. Симптомы поражения нервной системы при ПБ являются наиболее характерными отличительными признаками этой болезни. Тремор может варьировать от сильных ритмичных сокращений мышц задних ног и спины до едва различимого легкого дрожания головы, ушей и хвоста. Аномалии волосяного покрова наиболее ярко выражены у гладкошерстных пород, у которых развиваются длинные завитки шерсти, в особенности, в области шеи и спины. У ягнят, пораженных вирусом ПБ, может отмечаться также отсутствующая в норме черная или коричневая пигментация шерсти. У ягнят с подозрением на наличие заболевания, до того, как они начнут получать молозиво, необходимо произвести с использованием антикоагулянта отбор образцов крови для анализа на наличие BDV или антител к нему. Если ягнята начали получать молозиво, изоляция вируса затруднена до достижения животными 2-месячного возраста, в котором исчезают материнские антитела. Однако в течение указанного периода можно обнаружить вирусный антиген методами иммуногистохимии в образцах кожи, взятых посредством биопсии, или в отмытых лейкоцитах при помощи иммуноферментного анализа или метода ОТ-ПЦР в реальном времени. Методы ИФА, направленные на обнаружение антигена Erns, по всей видимости, менее подвержены влиянию материнских антител и часто используются для выявления антигена в сыворотке.

При бережном уходе часть ягнят с пограничной болезнью можно выводить, хотя летальный исход возможен в любом возрасте. Признаки поражения нервной системы постепенно уменьшаются и могут исчезнуть совсем по достижении животным возраста 3–6 месяцев. Слабость и дрожание задних конечностей, а также легкое дрожание головы могут возвращаться в периоды стресса. Рост больных ягнят часто замедлен, и в обычных условиях полевого содержания многие погибают до или в период отъема ягнят от матери. Это может являться первым проявляющимся признаком заболевания в случаях, когда потери в период окота невелики и у рожденных ягнят не наблюдается очевидных симптомов ПБ.

Некоторые случаи внутриутробного инфицирования на средних сроках беременности ведут к развитию у ягнят тяжелых поражений нервной системы, нарушений работы опорно-двигательного аппарата и аномалий в строении скелета. Такие ягнята страдают от гипоплазии мозжечка, гидроанэнцефалии и порэнцефалии, являющихся результатом некротизирующего воспаления. Тяжелые деструктивные поражения, по-видимому, несут иммуно-обусловленный характер, и ягнята с подобными нарушениями часто имеют высокие титры сывороточных антител к BDV. Большинство ягнят, инфицированных на поздних сроках беременности, здоровы и не имеют аномалий развития и рождаются свободными от вируса, но имеют антитела к BDV. Но некоторые ягнята, инфицированные на поздних сроках беременности, рождаются слабыми и могут погибнуть в раннем возрасте (Barlow & Patterson, 1982).

3. Персистирующая вирусемия

Если плод переносит заболевание до наступления состояния иммунокомпетентности и выживает, он рождается с персистирующей вирусемией. У овец способность реагировать на антигенный стимул впервые появляется у плода приблизительно между 60-м и 85-м днями беременности, которая длится в целом около 150 дней. У плодов, инфицированных до наступления иммунокомпетентности, размножение вируса носит неконтролируемый характер и, как правило, в 50% случаев наступает гибель плода. У ягнят, перенесших заболевание на ранних стадиях внутриутробного развития, вирус распространяется по всем органам. У таких ягнят, по-видимому, развивается толерантность к вирусу и для них характерна персистирующая инфекция, обычно сохраняющаяся на протяжении всей жизни. В образцах крови, взятых в период до получения молозива, обнаруживается вирус, но отсутствуют антитела. Как правило, воспалительных реакций не наблюдается, а наиболее характерные патологические изменения касаются центральной нервной системы (ЦНС) и кожных покровов. В нервной системе наблюдается дефицит миелина, что является причиной появления соответствующей симптоматики. Что касается кожных покровов, первичные волосяные фолликулы увеличиваются в размерах, и возрастает число вторичных волосяных фолликулов, что приводит к появлению густой или грубой шерсти.

Персистентно вирусемичных овец можно определить путем обнаружения вирусных антигенов, нуклеиновых кислот или инфекционных вирусов в образцах крови. Вирусемия легко выявляется при исследовании сыворотки в любой период времени, кроме двух первых месяцев жизни, когда наличие вируса может быть замаскировано присутствием материнских антител, содержащихся в молозиве, и, возможно, у животных старше 4 лет, у которых могут формироваться низкие уровни антител к BDV (Nettleton *et al.*, 1992). Чтобы избежать влияния антител на результаты анализа, следует предпочесть изоляции вируса иные методы. При подозрении на наличие молозивных антител обнаружить вирус можно в отмытых лейкоцитах и пробах кожи при помощи чувствительных методов ИФА. Хотя обнаружение вируса в крови в период острой инфекции затруднено, персистирующую вирусемию необходимо подтверждать повторным исследованием животных, производимым по прошествии, как минимум, трех недель. Во всех случаях и для любого типа образцов следует рассмотреть возможность использования ОТ-ПЦР в реальном времени по причине высокой аналитической чувствительности метода и отсутствия влияния со стороны содержащихся в образце антител.

Некоторые вирусемичные овцы доживают до половой зрелости и используются для разведения. Ягнята, рожденные такими инфицированными овцами, всегда персистентно вирусемичны. Для других животных персистентно вирусемичные овцы служат постоянным источником инфекционного вируса, и их выявление является основной составляющей любой программы, направленной на контроль заболевания. Овцы, являющиеся объектом продажи, должны проходить обследование на отсутствие вирусемии.

Как правило, персистентно инфицированные бараны имеют низкокачественную, высокоинфекционную сперму и

сниженную репродуктивную функцию. Все бараны, используемые в племенной работе, должны проходить обследование на наличие в анализах крови персистирующей инфекции. Образцы спермы также могут быть исследованы на наличие вируса, но изоляция вируса из спермы гораздо менее эффективна, чем из образцов крови из-за токсичности спермы для клеточных культур. Использование ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения нуклеиновой кислоты пестивируса, как правило, позволяет решить проблему токсичности, и, следовательно, данный метод полезен для анализа спермы баранов.

4. Позднее проявление болезни у персистентно вирусных овец

У некоторых персистентно вирусных овец, содержащихся отдельно от других животных, внезапно развивается не поддающаяся лечению диарея, слабость, обильные выделения из носа и глаз, иногда в сочетании с нарушением дыхания. При вскрытии у таких овец регистрируется общее утолщение дистального отдела подвздошной кишки, слепой и ободочной кишок, что является результатом очаговой гиперпластической энтеропатии. Из материала кишечника таких ягнят может быть выделен цитопатогенный вирус ПБ. При отсутствии очевидного внешнего источника цитопатогенного вируса, подобный вирус с наибольшей вероятностью поступает из собственного пула вирусов ягненка, аналогично тому, как это происходит в случае вируса BVDV. У других персистентно вирусных животных из той же группы развитие заболевания не происходит. Данный синдром, который был генерирован экспериментально и наблюдался в ходе отдельных вспышек ПБ, имеет определенное сходство с вирусной диареей крупного рогатого скота (Nettleton *et al.*, 1992).

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1: Методы анализа для диагностики пограничной болезни и их назначение

Метод	Назначение					
	Отсутствие вируса в популяции	Отсутствие вируса у отдельного животного перед перемещением	Роль в программах борьбы с заболеванием	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции (эпиднадзор)	Иммунный статус отдельного животного или популяции (после вакцинации)
Идентификация возбудителя¹						
Изоляция вируса	+	++	++	+++	–	–
Выявление антигена методом ИФА	+	++	+++	+++	–	–
Выявление НК методом ОТ-ПЦР	+++	+++	+++	+++	+++	–
Выявление НК методом ISH	–	–	–	+	–	–
Выявление иммунного ответа						
ИФА	++	++	++	+	++	++
PВН	+++	+++	++	+++	+++	+++

Основные обозначения: +++ = рекомендуемый метод, прошедший валидацию для указанных целей; ++ = пригодный метод, но может требоваться дальнейшая валидация; + = возможно использование в некоторых случаях, но затраты, надежность или иные факторы существенно ограничивают его применение; – = неприменим для данной цели; н/п = назначение неприменимо.

ИФА = иммуноферментный анализ; ИГХ = иммуногистохимия; НК = нуклеиновая кислота; ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ISH = гибридизация *in-situ*; PBN = реакция вируснейтрализации.

1. Идентификация возбудителя

Референтной лаборатории МЭБ по пограничной болезни не существует, но возможно получение консультации в референтных лабораториях по вирусной диарее крупного рогатого скота или классической чуме свиней (см. Таблицу в части 4 настоящего *Ветеринарно-санитарного кодекса МЭБ по наземным животным*). Одним из наиболее чувствительных методов идентификации BDV, доказавшим свою эффективность, остается изоляция вируса. Однако для исследования образцов, в отношении которых изоляция вируса является затруднительной, может применяться метод ОТ-ПЦР в реальном времени, обладающий широкой реактивностью (предпочтительно, в отношении широкого спектра пестивирусов), как правило, демонстрирующий более высокую степень аналитической чувствительности, чем изоляция вируса, и занимающий всего несколько часов. ИФА для обнаружения антигенов и иммуногистохимическое исследование срезов тканей также являются ценными методами выявления животных, инфицированных BDV.

¹ Рекомендуется применение комбинации различных методов идентификации возбудителя для исследования одной и той же клинической пробы.

1.1. Изоляция вируса

Важно, чтобы лаборатории, осуществляющие изоляцию вируса, имели надежный источник бычьей сыворотки и свободных от пестивируса чувствительных клеток или их эквивалента, не проявляющего противопестивирусной активности и не содержащего загрязняющих вирусов. Важно также наличие у лаборатории действующей программы контроля качества. В главе 2.4.7 приведены подробные методики изоляции вируса в культуральных пробирках или микропланшетах для изоляции пестивирусов из образцов материала, взятого у овец и коз, включая сыворотку, цельную кровь, сперму и ткани. Принципы и меры предосторожности, касающиеся выбора клеточных культур, компонентов среды и реагентов, изложенные в указанной главе, в равной степени относятся к настоящей главе. При условии, что для обнаружения антигенов или нуклеиновых кислот используются доказавшие свою эффективность реагенты, позволяющие определять широкий спектр пестивирусов (например, моноклональные антитела [MAb], праймеры и зонды для ОТ-ПЦР в реальном времени), принципиальная разница состоит в выборе надлежащих клеточных культур.

Изоляция вируса ПБ может осуществляться в ряде первичных или вторичных культур клеток овец (например, культур клеток почки, семенников, легкого). Линии клеток овцы для роста BDV немногочисленны. Могут использоваться полунепрерывные культуры клеток мышц овечьего плода (FLM), эмбриона (Thabti *et al.*, 2002) или сосудистого сплетения овцы, но у разных линий существенно варьирует восприимчивость к вирусу. Клетки овцы были успешно использованы для выделения и роста вирусов BDV и BVDV 1 и 2 типа, найденных у овец. Для регионов, где овцы могут заражаться вирусом ПБ от крупного рогатого скота, оптимальной является система изоляции вируса с использованием овечьих и бычьих клеток. Однако клетки крупного рогатого скота обладают более низкой восприимчивостью для первичной изоляции и роста некоторых вирусов ПБ, поэтому использовать только культуры клеток крупного рогатого скота не рекомендуется. Информация о подходящих культурах клеток крупного рогатого скота приведена в главе 2.4.7. Изложенные в указанной главе меры предосторожности, касающиеся получения клеток и компонентов среды, не загрязненных пестивирусами и антителами, а также меры, обеспечивающие восприимчивость клеток к широкому спектру местных полевых штаммов, в равной степени актуальны для систем, предназначенных для обнаружения BDV.

Если говорить о живых животных, то для проведения анализов на наличие инфекционного вируса наиболее часто используют образцы сыворотки. Однако для сложных случаев наиболее чувствительный метод подтверждения пестивирусной виремии состоит в многократном промывании лейкоцитов (не менее трех раз) в культуральной среде перед культивированием совместно с восприимчивыми к вирусу клетками в культуральных пробирках или микропланшетах. После 5-7-дневного культивирования культуры подвергают одному циклу замораживания-оттаивания и осуществляют перенос аликвоты разведенной культуральной жидкости в другую культуру восприимчивых к вирусу клеток, выращенных в микропланшетах или слайд-камерах, для иммуноцитохимического обнаружения антигена. Окрашивание для обнаружения нецитопатогенных пестивирусов, как правило, позволяет выявить вирус в конце первого пассажа, но чтобы обнаружить медленно растущие вирусы в клетках, обладающих невысокой перmissивностью, желательно провести два пассажа. Рекомендуется разводить супернатант клеточной культуры, используемый в качестве инокулята для проведения второго пассажа, в новой культуральной среде из расчета примерно 1/100, поскольку некоторые полевые изоляты с высокими титрами будут плохо размножаться в случае неразведенного пассажа (то есть, при высокой множественности заражения).

Образцы тканей, взятые у погибших животных, следует помещать в транспортную среду для сохранения вирусов. В лаборатории образцы измельчают для получения 10–20%-й (вес/объем) суспензии, центрифугируют для удаления дебриса, и супернатант пропускают через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Для целей изоляции вируса лучше всего использовать ткани селезенки, легкого, щитовидной железы, вилочковой железы, почки, головного мозга, лимфатических узлов и поражений кишечника.

Сперму также можно исследовать на наличие BDV, но необработанная сперма обладает высокой цитотоксичностью, и должна быть разведена в соотношении, как правило, не менее 1/10 в культуральной среде. Поскольку наибольшую угрозу представляет зараженная BDV сперма персистентно инфицированных баранов, для выявления таких животных предпочтительнее использовать кровь, которая является более надежным клиническим препаратом, чем сперма. Существует множество вариантов протокола изоляции вирусов. Все они должны быть оптимизированы для достижения максимальной чувствительности с использованием стандартного референтного препарата вируса и, по возможности, недавно выявленных полевых изолятов BDV. Большинство ограничений, связанных с изоляцией вируса для обнаружения BDV в сыворотке или крови, тканях или сперме, может быть преодолено посредством использования ОТ-ПЦР в реальном времени – хорошо зарекомендовавшего себя, высокочувствительного метода, позволяющего определять широкий спектр пестивирусов. Некоторые лаборатории анализируют образцы методом ОТ-ПЦР в реальном времени и осуществляют изоляцию вируса с участием тех образцов, которые дали положительный результат, с целью получения различных штаммов BDV в качестве референтного материала и для проведения дальнейших научных исследований.

Конкретная техническая информация о протоколах изоляции вируса, включая окрашивание иммунопероксидазой, содержится в главе 2.4.7.

1.2. Методы обнаружения нуклеиновых кислот

К настоящему времени получена и проанализирована путем сравнения с другими пестивирусами полная геномная последовательность трех вирусов ПБ (Becher *et al.*, 1998; Ridpath & Bolin, 1997). Филогенетический анализ показывает, что вирусы ПБ более тесно связаны с CSFV, чем с BVDV (Becher *et al.*, 2003; Van Rijn *et al.*, 1997; Vilcek & Nettleton, 2006; Vilcek *et al.*, 1997). Широкое распространение в диагностике пестивирусной инфекции получил метод ОТ-ПЦР в реальном времени, для которого существует несколько форматов. Преимуществом ОТ-ПЦР в реальном времени является способность обнаруживать как инфекционный вирус, так и остаточную нуклеиновую кислоту, которая

представляет ценность для исследования причин абортос и смертности среди ягнят. Кроме того, присутствие в образце специфических антител не оказывает негативного влияния на результат ОТ-ПЦР в реальном времени. Этот метод эффективен также при исследовании спермы и, при применении рекомендованных протоколов для экстракции нуклеиновой кислоты, он в меньшей степени подвержен влиянию компонентов спермы по сравнению с методом изоляции вируса. Поскольку для мелких жвачных животных существует возможность заражения генетически различающимися штаммами BDV или штаммами BVDV, следует использовать проверенную методику ОТ-ПЦР в реальном времени для определения широкого спектра пестивирусов. Соответствующие протоколы для экстракции нуклеиновых кислот и для ОТ-ПЦР в реальном времени представлены в главе 2.4.7. Должны тщательно соблюдаться все меры предосторожности для минимизации риска лабораторного заражения исследуемого материала.

После исследования образцов на наличие пестивирусов, те образцы, которые дали положительный результат, могут быть подвергнуты дальнейшему изучению методом BDV-специфической ОТ-ПЦР в реальном времени (Willoughby *et al.*, 2006). Однако важно отметить, что в некоторых популяциях, особенно в популяциях диких жвачных животных, таких, как серны и олени, могут циркулировать различные генотипы BDV, которые могут передаваться овцам. Следует применять метод, обладающий специфичностью в отношении BDV, не забывая при этом, что разновидности или ранее не выявлявшиеся генотипы вируса могут остаться необнаруженными, что подтверждает ценность исходного скрининга образцов при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени.

1.3. Иммуноферментный анализ для обнаружения антигенов

ИФА для прямого определения антигенов пестивируса в образцах крови и тканей инфицированных животных доказал свою высокую эффективность в решении задач выявления персистентно инфицированных животных и диагностики заболевания. Первая методика ИФА для обнаружения пестивирусных антигенов была разработана для выявления вирусемических овец и позднее была трансформирована в двойной «сэндвич»-вариант ИФА с моноклональными антителами для исследования овец и крупного рогатого скота (Entrican *et al.*, 1994). Данный тест чаще всего применяется для выявления персистентно вирусемических овец и предусматривает использование отмытых, лизированных детергентом лейкоцитов крови. Чувствительность метода приблизительно такая же, как у метода изоляции вируса, и он является практическим методом для исследования большого количества образцов крови. Так же, как в случае изоляции вируса, высокие уровни молозивных антител могут маскировать персистирующую вирусемию. При наличии в образцах антител, ИФА более эффективен, чем изоляция вируса, но может давать ложно-отрицательные результаты у вирусемических ягнят в возрасте моложе 2 месяцев. ИФА, как правило, недостаточно чувствителен для обнаружения в пробах крови острой инфекции, вызываемой BDV. Наряду с исследованием лейкоцитов, рассматриваемый вариант ИФА может быть использован для анализа суспензий тканей, в особенности, селезенки, взятых у овец с подозрением на персистирующую вирусемию, а также, в качестве альтернативы методу иммунофлуоресценции и пероксидазному методу, для анализа клеточных культур. Опубликовано несколько методик ИФА для обнаружения пестивирусов, но в настоящее время в продаже отсутствуют наборы для обнаружения BDV, прошедшие полную валидацию. Перед применением в целях, предписанных нормативным регулированием, указанные наборы должны пройти валидацию в регионе, где предполагается их использование. Валидация подтверждает, что набор позволяет обнаружить широкий спектр полевых штаммов BDV и подходит для типов образцов, которые предполагается исследовать.

1.4. Иммуногистохимическое исследование

Обнаружить вирусный антиген можно в большинстве тканей персистентно инфицированных животных (Braun *et al.*, 2002; Thur *et al.*, 1997), хотя этот метод не используется для целей рутинной диагностики. Исследованию подвергаются замороженные срезы тканей (криостатные срезы), фиксированные в ацетоне, или образцы, заключенные в парафиновый воск, с использованием соответствующих антител. Подходящими являются антитела, реактивные по отношению к пестивирусным антигенам и обладающие специфичностью к NS2-3. Высокая концентрация вирусного антигена наблюдается в тканях мозга, щитовидной железы, легких и слизистой рта. Биопсия кожи доказала свою эффективность для диагностики персистирующей BDV-инфекции *in-vivo*.

2. Серологические исследования

Антитела к вирусу ПБ обычно определяют в овечьей сыворотке при помощи реакции вируснейтрализации или ИФА. Менее чувствительный метод иммунодиффузии в агаровом геле не рекомендован. В каждом тесте используются положительная и отрицательная контрольные сыворотки. Они должны показывать значения, находящиеся в заранее установленных пределах, чтобы результаты теста были признаны достоверными. Одиночные сыворотки могут подвергаться анализу с целью определения распространенности BDV в стаде, регионе или стране. Однако в диагностических целях, для подтверждения острой инфекции, вызванной вирусом BDV, лучше всего использовать образцы сыворотки, взятые в острой фазе заболевания и в период выздоровления. Парные сыворотки от одного животного должны всегда исследоваться одновременно, в одном планшете, чтобы обеспечить достоверное сравнение титров.

2.1. Реакция вируснейтрализации

Антигенные различия среди пестивирусов осложняют выбор тест-вируса (Dekker *et al.*, 1995; Nettleton *et al.*, 1998). Ни один из штаммов BDV не является идеальным вариантом. Следует использовать местный штамм, дающий наибольший титр антител с рядом положительных овечьих сывороток.

Поскольку известно лишь небольшое количество цитопатогенных штаммов BDV, чаще используется репрезентативный местный нецитопатогенный штамм, при этом результаты теста считаются после иммунопероксидазного окрашивания

клеток. Подходящим материалом являются доказавшие свою высокую восприимчивость культуры клеток овцы, свободные от пестивирусов, например, клетки семенников или почек ягненка. Их можно сохранять криогенной заморозкой для использования в течение длительного периода времени. Меры предосторожности, касающиеся отбора компонентов питательной среды, свободных от пестивирусов, в равной степени применимы к реагентам, используемым для проведения реакции вируснейтрализации. Рекомендуемый протокол исследования приведен ниже.

2.2.1. Протокол исследования

- i) Исследуемые сыворотки инактивируют нагреванием в течение 30 мин. при 56°C.
- ii) Начиная с разведения 1/4, осуществляют серийные двукратные разведения исследуемых сывороток в плоскодонном 96-луночном микротитрационном планшете для клеточных культур, используя в качестве раствора для разведения среду для клеточных культур. Для каждого образца используют три или четыре лунки для каждого разведения, в зависимости от требуемой степени точности. Кроме того, для каждого образца и для каждого разведения сыворотки оставляют одну лунку без добавления вируса с целью мониторинга признаков токсичности образца, которая может имитировать вирусную цитопатологию или препятствовать размножению вируса. В каждую серию тестов следует включать также контрольные положительную и отрицательную сыворотки.
- iii) В каждую лунку добавляют одинаковый объем (например, 50 мкл) препарата вируса ПБ, содержащего 100 ТЦД₅₀ (50% средняя инфицирующая тканевую культуру доза). Кроме того, в нескольких оставшихся незанятых лунках проводят обратное титрование препарата вируса для проверки активности вируса (допустимые пределы: 30–300 ТЦД₅₀).
- iv) Планшет инкубируют в течение 1 часа при 37°C.
- v) Культуральный флакон с подходящей клеточной культурой (например, клетки семенников или почки овцы) обрабатывают трипсином и доводят концентрацию клеток до 2×10^5 /мл. 100 мкл суспензии клеток добавляют в каждую лунку микротитрационного планшета.
- vi) Планшет инкубируют при 37°C в течение 4–5 дней, в запечатанном виде или в атмосфере, содержащей 5% CO₂.
- vii) Лунки исследуют под микроскопом, чтобы убедиться в отсутствии признаков токсичности или цитопатического эффекта (ЦПЭ), затем проводят фиксацию и иммунопероксидазное окрашивание, используя соответствующие моноклональные антитела (MAb). Титр вируснейтрализации для каждой сыворотки представляет собой разведение, при котором вирус нейтрализуется в 50% лунок. Этот показатель может быть вычислен методом Спирмена-Кербера или методом Рида и Менча. У серонегативного животного нейтрализация не наблюдается при самом слабом разведении (то есть, 1/4), соответственно конечному разведению 1/8. Для точного сравнения титров антител, и, в частности, для демонстрации существенного (более, чем в четыре раза) изменения титра, образцы следует анализировать параллельно в рамках одного и того же теста.
- viii) В некоторых случаях может возникнуть необходимость определить, являются ли обнаруженные в стаде антитела специфическими к вирусу конкретной серологической группы пестивирусов. Может быть проведен анализ дифференциальной вируснейтрализации, в ходе которого сыворотки титруют репрезентативными вирусами каждой из четырех групп пестивирусов, то есть, BDV, BVDV типы 1 и 2, и CSFV. Наибольший титр укажет на нужный серотип, также будет определен спектр перекрестной реактивности с другими серотипами.

2.2. Иммуноферментный анализ

Существует «сэндвич»-вариант ИФА на основе MAb, предназначенный для обнаружения антител к BDV. Два моноклональных антитела, нейтрализующих широкий спектр пестивирусных антигенов и связывающихся с разными эпитопами иммунодоминантного неструктурного белка NS 2/3, используются для захвата антигена вируса, полученного выращиванием в клеточной культуре с последующим разрушением клеток в результате обработки детергентом. Результаты имеют качественную корреляцию с результатами реакции вируснейтрализации (Fenton *et al.*, 1991).

2.2.1. Подготовка антигена

Используют восемь флаконов (площадь роста 225 см²) свежих конфлоэнтных культур клеток мышечной ткани овечьего плода (FLM); четыре флакона служат в качестве контроля и четыре подвергаются инфицированию. Флаконы промывают и четыре из них инфицируют цитопатогенным BDV (НИИ Moredun; множественность заражения 0,01–0,1). Дают вирусу адсорбироваться в течение 2 часов при 37°C. Добавляют поддерживающую среду (свободную от антител к BDV), содержащую 2% ФСБ, и инкубируют культуры в течение 4-5 дней до появления очевидного ЦПЭ. Объединяют супернатанты из четырех контрольных флаконов и отдельно объединяют супернатанты из четырех инфицированных флаконов. Центрифугируют при 3000 **g** в течение 15 минут для осаждения клеток. Удаляют супернатант и сохраняют осадок, содержащий клеточную массу. Промывают флаконы 50 мл ФСБ и повторяют вышеописанный этап центрифугирования. Объединяют осадок из всех контрольных флаконов, помещают в 8 мл ФСБ, содержащего 1% Nonidet P40, и возвращают по 2 мл в каждый контрольный флакон для лизирования оставшихся иммобилизованных клеток. Повторяют эту процедуру для инфицированных клеток. Выдерживают флаконы при 4°C не менее 2 часов, каждые 30 минут энергично взбалтывая небольшое количество жидкости, покрывающей клетки, чтобы обеспечить полное отделение клеток. Центрифугируют контрольный и инфицированный образцы при 12 000 **g** в течение 5 минут для удаления клеточного дебриса. Содержащие антиген супернатанты хранят при –70°C в небольших аликвотах.

2.2.2. Протокол исследования

- i) Два вида MAb разводят до предварительно установленного значения в 0,05 М бикарбонатном буфере, pH 9,6. Все лунки подходящего микротитрационного планшета для ИФА (например, Nunc maxisorb, Greiner 129b) сенсibiliзируют в течение ночи при 4°C.

- ii) После трехкратного промывания в ФСБТ (ФСБ + твин), во все лунки добавляют блокирующий раствор ФСБТ, содержащий 10% лошадиной сыворотки (ФСБТЛС), и инкубируют при 37°C в течение 1 часа.
- iii) Препарат антигена разводят до предварительно установленного значения в ФСБТЛС, и чередуют ряды лунок, сенсibilизированных контрольным раствором и раствором вирусного антигена. Инкубируют в течение 1 часа при 37°C. Затем планшеты трижды промывают в ФСБТ перед добавлением исследуемой сыворотки.
- iv) Исследуемые сыворотки разводят 1/50 в ФСБТЛС и добавляют в две лунки с контрольным раствором и в две лунки с раствором вирусного антигена для каждой сыворотки. Оставляют на 1 час при 37°C. Затем планшеты трижды промывают в ФСБТ.
- v) Конъюгат пероксидазы с антителами к IgG овцы разводят ФСБТЛС до предварительно установленного значения, добавляют во все лунки и оставляют на 1 час при 37°C. Планшеты трижды промывают в ФСБТ.
- vi) Добавляют подходящий активированный ферментный субстрат / хромоген, например, ортофенилендиамин (OPD) или тетраметилбензидин (ТМБ). После появления окраски реакцию останавливают добавлением серной кислоты и измеряют поглощение при помощи ИФА-спектрофотометра для считывания микропланшетов. Чтобы получить скорректированное значение поглощения для каждой сыворотки, среднее значение для двух лунок, содержащих контроль, вычитают из среднего значения для двух лунок, содержащих образец вируса. Результаты выражают в виде скорректированного значения поглощения по отношению к скорректированному поглощению известных положительной и отрицательной сывороток. В качестве альтернативы, титры в ИФА можно экстраполировать, исходя из стандартной кривой для серии разведений известной положительной референтной сыворотки.

Если возможно получить антигены, обладающие достаточной активностью, стадию захвата с участием МАb можно исключить. В этом случае чередующиеся ряды лунок сенсibilизируют раствором вирусного антигена и контрольным раствором, разведенными 0,05 М бикарбонатным буфером, рН 9,6, до предварительно установленной величины, в течение ночи при +4°C. Планшеты промывают и блокируют, как описано в пункте ii выше. После промывания добавляют разведенные исследуемые сыворотки и продолжают процедуру, начиная с пункта iv.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общие сведения

Действенная вакцина против вируса ПБ должна быть эффективной при введении самкам перед случкой, с целью предотвращения внутриутробного заражения. В Европе производятся экспериментальные и коммерческие инактивированные цельновирioнные вакцины против BDV (Brun *et al.*, 1993; Vantsis *et al.*, 1980). В отличие от вакцин против BVDV, спрос на вакцины против вируса ПБ ограничен, и производятся только инактивированные продукты. Коммерческое производство живых аттенуированных или рекомбинантных субъединичных вакцин против BDV отсутствует.

Доказано, что пестивирусы-контаминанты модифицированных живых противовирусных вакцин являлись источником серьезных заболеваний после введения их свиньям, крупному рогатому скоту, овцам и козам. В число загрязненных вакцин входили вакцины, использовавшиеся для контроля распространения болезни Ауески, классической чумы свиней, ротавирусной и коронавирусной инфекций, чумы крупного рогатого скота, овечьей оспы и контактного пустулезного дерматита. Коварная способность пестивирусов проникать через плаценту и вызывать, как следствие, персистирующую инфекцию обуславливает загрязнение вакцин пестивирусами через клеточный материал, сыворотку, используемую в качестве дополнительного компонента питательной среды, или исходный посевной вирусный материал. Поскольку практически все изоляты пестивирусов нецитопатогенны, они будут оставаться незамеченными до проведения специальных тестов. Хотя контаминация подобного рода с меньшей вероятностью вызовет проблемы с инактивированной вакциной, тем не менее, должны быть предприняты шаги для обеспечения чистоты материалов, используемых в производстве вакцин.

1.1. Характеристики целевого профиля продукта

Противопестивирусные вакцины традиционно подразделяют на два класса: модифицированные живые и инактивированные. Ключевым требованием для обоих типов вакцин является высокий уровень предотвращения внутриутробного заражения. Для борьбы с BDV производятся только инактивированные вакцины. Надлежащим образом составленные и изготовленные инактивированные вакцины абсолютно безопасны для применения, но, с целью достижения удовлетворительного уровня иммунной защиты, они, как правило, требуют повторной (бустерной) вакцинации, что может доставлять неудобства. Вследствие высокой антигенной вариативности вакцина должна содержать штаммы BDV, как можно точнее соответствующие вирусам, выявленным на территории, где предполагается использование вакцины. Это может представлять проблему для регионов, в которых обнаружено несколько типов антигенов. Из-за необходимости адаптировать вакцины к штаммам, чаще всего встречающимся на территории страны или региона, нецелесообразно создавать банк вакцинных антигенов для использования в глобальном масштабе.

Руководство по производству ветеринарных вакцин приведено в Главе 1.1.8 «Принципы производства ветеринарных вакцин». Руководящие рекомендации, приведенные здесь и в главе 1.1.8, носят общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

2. Общая информация по производству вакцин и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

Идеальная вакцина должна содержать штамм или штаммы вируса, которые обеспечивают защиту против всех пестивирусов, поражающих овец. Однако такая задача может оказаться затруднительной из-за диапазона пестивирусов, способных инфицировать овец. Среди пестивирусов наблюдаются существенные антигенные различия – как между вирусами, которые могут быть отнесены к геногруппе BDV, так и между вирусами генотипов BVDV1 и BVDV2 (Wensvoort *et al.*, 1989; Becher *et al.*, 2003; Vilcek & Nettleton, 2006). Описан также случай заражения овцы предполагаемым генотипом BVDV-3 (Decaro *et al.*, 2012). Существует большая вероятность того, что антигенный состав вакцины будет варьировать от региона к региону, чтобы обеспечить надлежащее антигенное соответствие доминирующим вирусным штаммам. Для создания оптимальных комбинаций необходимы исследования в области перекрестной нейтрализации. Тем не менее, по-видимому, любая вакцина против BDV должна включать, как минимум, по одному представителю групп BDV и BVDV (тип 1). Характеризация биологически клонированных вакцинных вирусов предусматривает типирование с использованием MAб и генотипирование (Paton *et al.*, 1995).

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

Крайне важно обеспечить, чтобы все материалы, используемые при производстве антигенов, входящих в состав вакцины, проходили расширенную проверку с целью исключить присутствие посторонних веществ. Сюда относятся исходный и рабочий посевной материал, клеточные культуры и дополнительные компоненты питательной среды, например, бычья сыворотка. Некоторые вирусы, вызывающие болезни крупного рогатого скота, в частности, вирус диареи крупного рогатого скота (BVDV), могут инфицировать мелкий рогатый скот, например, овец. Следовательно, особенно важно гарантировать, чтобы в любой используемой сыворотке, полученной от крупного рогатого скота, отсутствовали как занесенные BVDV, так и антитела к штаммам BVDV, поскольку вирус и антитела в малых количествах могут маскировать присутствие друг друга. Материалы и вакцинные штаммы должны проходить проверку на стерильность и отсутствие контаминантов, в особенности, посторонних вирусов, как описано в главах 1.1.8 и 1.1.9 «Проверка биологических материалов, предназначенных для ветеринарных целей, на стерильность и отсутствие загрязнения».

Если вакцина проходит базовые испытания, эффективность вакцинации должна оцениваться, прежде всего, на основании способности предотвращать передачу заболевания через плаценту. Эффективные результаты контрольного заражения вакцинированных беременных самок на сроке беременности 50–60 дней были достигнуты путем интраназального введения вируса или путем смешивания с персистоно вирусными животными (Brun *et al.*, 1993). У овец, не имеющих иммунитета к заболеванию, это приводит обычно к появлению персистоно вирусного потомства. В регионах, где часто отмечают появление различных генотипов BDV, должна быть исследована эффективность защиты против различных штаммов.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Инактивированные вакцины производят с применением стандартных лабораторных методов на основе стационарных или перемешиваемых клеточных культур. Инактиваторы включают формалин и бета-пропиолактон. В качестве адъювантов используют гидроксид алюминия и масло (Brun *et al.*, 1993; Vantsis *et al.*, 1980). Оптимальный выход продукции зависит от используемого типа клеток и изолята. Коммерческая вакцина против BDV, содержащая два штамма вируса, производится на основе культур клеток овцы (Brun *et al.*, 1993). Клетки получают в соответствии с системой посевных материалов из исходного посевного материала (ИПМ), свободного от любых загрязняющих микроорганизмов. Вакцина производится только из клеток, получение которых включало менее 20 пассажей (считая от ИПМ). Контрольные клетки из каждого пассажа проверяют на загрязненность пестивирусами. Используют стандартный протокол, при этом ожидается, что нецитопатогенный вирус будет получен через 4-7 дней после инокуляции культуры. Оптимальный выход инфекционного вируса будет зависеть от нескольких факторов, включая используемые клеточную культуру и изолят, а также исходную плотность посева вируса. Эти факторы следует учитывать, и исследовать кинетику размножения вируса с целью нахождения оптимальных условий для масштабного производства вируса. Как в случае живой, так и в случае инактивированной вакцины важной целью является получение вирусного материала с высокими титрами. Далее может быть произведен препарат антигена в соответствии с типом вакцины.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Для производства вакцин против BDV обычно используют культуры клеток овцы, к которым часто добавляют компоненты питательной среды животного происхождения. Материалом, который вызывает наибольшие опасения, является бычья сыворотка вследствие возможности ее заражения вирусами ПБ и антителами к этим вирусам. Указанные контаминанты не только влияют на эффективность производства, но также могут маскировать присутствие малых количеств инфекционных BVDV, которые могут обладать нежелательными характеристиками. Помимо вирусного посевного материала, все ингредиенты должны пройти проверку на стерильность и отсутствие контаминантов, в особенности, посторонних вирусов, как изложено в главах 1.1.8 и 1.1.9. Кроме того, страна происхождения материалов, взятых от крупного рогатого скота и овец, должна иметь пренебрежимо малый уровень риска в отношении трансмиссивной губчатой энцефалопатии (см. главу 1.1.9).

2.2.3. Технологический контроль

Технологический контроль является частью процесса производства. Следует осуществлять регулярную проверку клеточных культур для обеспечения их чистоты и отсутствия существенного бактериального загрязнения и, по мере необходимости, проводить мониторинг состояния клеток и развития или отсутствия ЦПЭ. Поскольку базовым требованием в отношении эффективности является способность вызывать ответную реакцию в виде приемлемого уровня нейтрализующих антител, в ходе производства мониторинг целевых концентраций антигена, требуемых для получения удовлетворительного иммунного ответа, может осуществляться косвенно путем оценки произведенного количества инфекционного вируса или антигена. Для мониторинга производства антигена BVDV используются методы экстренной диагностики, например, ИФА. В качестве альтернативы, качество партии антигена можно определить титрованием количества присутствующего инфекционного вируса, хотя существует риск недооценки количества антигена. В случае инактивированных вакцин, перед инаktivацией проводится оценка инфекционности. Для данного типа вакцин требуется установление кинетических характеристик инаktivации с целью определения и внедрения в процесс производства соответствующих границ безопасности. На заключительной стадии производственного процесса проводится анализ клеточных культур *in vitro* для подтверждения полного завершения инаktivации. Подобный анализ безвредности включает достаточное число пассажей и достаточный объем инокулята с целью гарантировать обнаружение даже очень малых концентраций инфекционного вируса в случае его присутствия.

2.2.3. Анализ партии готового продукта

i) Стерильность

Тесты для проверки биологических материалов на стерильность и отсутствие загрязнения изложены в главе 1.1.9.

ii) Идентичность

Тест на идентичность должен продемонстрировать отсутствие других штаммов BDV в случае, когда на предприятии, производящем мультивалентные вакцины, выращивается несколько штаммов.

iii) Безвредность

Образцы инаktivированной вакцины должны проходить тщательную проверку на наличие живого вируса. Пробы продукта должны подвергаться пассированию (как минимум, три пассажа) в чувствительных культурах клеток для подтверждения отсутствия живого BDV. Данный мониторинг *in vitro* может быть подкреплён введением двум овцам с отрицательными результатами серологического исследования на BDV 20-ти доз чистого антигена в рамках стандартного теста на безвредность. Присутствие живого вируса приведет к развитию более серьезного серологического ответа по сравнению с инаktivированным вирусом. Сыворотка овец может быть исследована также на наличие антител к другим факторам, согласно предписаниям.

Исследование на безвредность должно включать также выявление любых отклоняющихся от нормы нежелательных местных или системных реакций для всех способов введения вакцины. Исследование на безвредность проводится по принципу «от партии к партии», если безвредность продукта не доказана и соответствующая информация не содержится в регистрационном досье, а производственный процесс не соответствует изложенному в главе 1.1.8. Безвредность вакцины должна быть продемонстрирована на беременных овцах (то есть, должна отсутствовать передача инфекции плоду), или же вакцина должна быть лицензирована с условием не использовать ее в отношении беременных животных.

iv) Специфическая активность партии

Активность вакцины лучше всего определять на серонегативных овцах, у которых проверяют появление антител и измеряют их концентрацию. Вакцины против BVD должны вызывать развитие адекватного иммунного ответа при использовании конечного состава препарата в соответствии с приложенной инструкцией производителя. Определяется минимальное количество инфекционного вируса или антигена, требуемое для развития удовлетворительного иммунного ответа. Косвенной мерой активности служит уровень инфекционности вируса до инаktivации. Для мониторинга отдельных партий в процессе производства применяются анализы *in vitro*. Содержание антигена после инаktivации определяется при помощи «сэндвич»-ИФА с использованием МАb и соотносится с результатами, полученными при исследовании активности вакцины *in vivo*. Должно быть доказано, что самая малая рекомендованная доза вакцины может предотвращать у беременных овец внутриутробное инфицирование плода вирусом ПБ.

2.3. Требования для получения разрешения, регистрации и лицензирования

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины в компетентные органы должны быть представлены все соответствующие сведения, касающиеся производства вакцины и контроля качества. Если компетентными органами не предписано иное, должна быть представлена информация в отношении трех последовательно произведенных партий вакцины объемом не менее 1/3 стандартного промышленного объема.

Стандартного метода производства вакцины против BDV не существует, но могут быть использованы общепринятые лабораторные методы на основе стационарных, перемешиваемых или суспензионных (микроносители) клеточных культур. Инактивированные вакцины могут изготавливаться обычными методами, например, инактивацией при помощи бинарного этиленмина, формалина или бета-пропиолактона (Park & Volin, 1987). Могут применяться различные адъюванты.

2.3.2. Требования в отношении безвредности

Необходимо проведение тестов *in vivo* с повторным введением вакцины (с учетом максимального числа доз для первичной вакцинации и, если применимо, первой ревакцинации/ бустерной вакцинации) и с использованием максимального разрешенного количества антигена, а также, в зависимости от состава вакцины, максимального числа вакцинных штаммов.

i) Безвредность для целевых и нецелевых видов животных

Безвредность конечного состава инактивированной вакцины следует оценивать в отношении восприимчивых к вирусу молодых овец, не имеющих антител, перешедших к ним от матери, и в отношении беременных овец. После введения вакцины необходимо фиксировать появление любых местных реакций, а у беременных овец – любого воздействия на еще не родившегося ягненка.

ii) Реверсия вирулентности для аттенуированных/ живых вакцин и охрана окружающей среды

В случае разработки живой вирусной вакцины против BDV, молодым ягнтям должен вводиться посевной вирусный материал, прошедший не менее, а лучше более предписанного числа пассажей, для подтверждения отсутствия признаков заболевания. В случае регистрации живой аттенуированной вакцины, предназначенной для введения беременным животным, проверка реверсии вирулентности должна проводиться с участием, в том числе, беременных животных. Живые аттенуированные вакцины не должны служить причиной инфицирования невакцинированных контактирующих животных.

iii) Меры предосторожности (угрозы)

BDV не представляет опасности для здоровья человека. Для работы с вирусом в лаборатории достаточно соблюдения правил стандартной добросовестной практики микробиологических исследований. В то время как инактивированный вирус, содержащийся в вакцине, считается безвредным для людей, вводящих продукт, входящие в состав вакцины адъюванты могут нанести человеку вред. Производители должны обеспечить наличие надлежащего предупреждения о необходимости обращения к врачу в случае самоинъецирования (в отношении адъювантов, масляной эмульсии, консервантов, и пр.). Предупреждение должно быть размещено на этикетке продукта и в инструкции по применению препарата, чтобы специалист, проводящий вакцинацию, был проинформирован о любой опасности.

2.3.3. Требования к эффективности

Активность вакцины определяют путем инокуляции ягнтям, у которых не обнаружен вирус или антитела к нему, с последующим мониторингом иммунного ответа в виде формирования антител. Содержание антигена устанавливают путем определения титра инфекционности до инактивации вакцины и после с помощью ИФА и корректируют в соответствии со стандартным уровнем для конкретной вакцины. Стандартизированные протоколы исследований, применимые для всех вакцин, отсутствуют. Для партий живой вакцины можно определять титр инфекционности. Каждая партия продукта должна проходить проверку, включающую определение активности и тесты на безвредность, в качестве критериев для получения разрешения на выпуск партии. Вакцины против BVD должны демонстрировать способность вызывать адекватный иммунный ответ, как указано выше, при применении конечного состава вакцины в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя.

2.3.4. Вакцины, в отношении которых применима стратегия DIVA (выявление инфекции у вакцинированных животных)

На настоящий момент нет коммерческих вакцин против BDV, позволяющих применять стратегию DIVA.

2.3.5. Продолжительность иммунитета

Инактивированные вакцины, как правило, не обеспечивают устойчивый уровень иммунитета, и весьма вероятно, что после первичного курса из двух-трех инъекций потребуются ежегодное введение бустерных доз. На данный момент недостаточно данных, чтобы сделать вывод о наличии корреляции между титрами образующихся после введения вакцины антител у матери и степенью защиты плода. Поскольку коммерческие вакцины, скорее всего, имеют различный состав с использованием спектра адъювантов, продолжительность сохранения иммунитета также может быть различной. Следовательно, данные о продолжительности иммунитета должны быть получены для каждого имеющегося в продаже продукта путем осуществления контрольных заражений по окончании заявленного производителем срока сохранения иммунитета.

2.3.6. Стабильность

Не существует утвержденных рекомендаций в отношении стабильности вакцин против пограничной болезни, но можно предположить, что вакцина, содержащая инактивированный вирус, должна сохранять активность в течение 1 года и даже более при хранении при 4°C. Более низкие температуры могли бы увеличить срок хранения, но этому могут препятствовать адъюванты, содержащиеся в вакцине с убитым вирусом. Препарат антигена, не вошедший в конечный состав вакцины, может надежно храниться в замороженном виде при низких температурах, но необходимо осуществлять мониторинг качества антигена с использованием анализов *in vitro* до его введения в партию вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BARLOW R.M. & PATTERSON D.S.P. (1982). Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med. (Suppl. J. Vet. Med.)*, **36**, 1–87.
- BECHER P., AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., CEDILLO ROSALES S., KONIG, M., SCHWEIZER M., STALDER H., SCHIRRMER H & THIEL H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterisation of novel pestivirus genotypes; Implications for classification. *Virology*, **311**, 96–104.
- BECHER P., ORLICH M. & THIEL H.-J. (1998). Complete genomic sequence of border disease virus a pestivirus from sheep. *J. Virol.*, **72**, 5165–5173.
- BRAUN U., HILBE M., EHRENSPERGER F., SALIS F., ALTHER P., STRASSER M., STALDER H.P. & PETERHANS E. (2002). Border Disease in einem Schafbetrieb. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **144**, 419–426.
- BRUN A., LACOSTE F., REYNAUD G., KATO F. & SAINT-MARC B. (1993). Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep. *In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*, Edwards S., ed. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France, 1–3 October 1992, 257–259
- CARLSSON U. (1991). Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.*, **128**, 145–147.
- CHAPPUIS G., BRUN A., KATO F., DAUVERGNE M., REYNAUD G. & DURET C. (1986). Etudes serologiques et immunologiques realisees a la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovina chez des moutons de L'Aveyron. *In: Pestiviruses des Ovins et des Bovins*, Espinasse J. & Savey M. eds. Ste Françoise de Buiatrie, Paris, France, **55**, 66.
- DECARO N., MARI V., LUCENTE M., SCIARRETTA R., MORENO A., ARMENISE C., LOSURDO M., CAMERO M., LORUSSO E., CORDIOLI P., & BUONAVOGLIA C. (2012). Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. *Vet. Microbiol.*, **155**, 165–171.
- DEKKER A., WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1995). Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross-neutralisation assays. *Vet. Microbiol.*, **47**, 317–329.
- ENTRICAN G., DAND A. & NETTLETON P.F. (1994). A double monoclonal-antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **43**, 65–74.
- FENTON A., SINCLAIR J.A., ENTRICAN G., HERRING J.A. & NETTLETON P.F. (1991). A monoclonal antibody capture ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep sera. *Vet. Microbiol.*, **28**, 327–333.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (2016). Virus Taxonomy 2015 release. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- NETTLETON P.F., GILMOUR J.S., HERRING J.A. & SINCLAIR J.A. (1992). The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, **15**, 179–188.

- NETTLETON P.F., GILRAY J.A., RUSSO P. & DLISSI E. (1998). Border disease of sheep and goats *Vet. Res.*, **29**, 327–340.
- OGUZOGLU T.C., FLOEGEL-NIESMANN G., FREY H.R. & MOENNIG V. (2001). Differential diagnosis of classical swine fever and border disease: seroepidemiological investigation of a pestivirus infection on a mixed sheep and swine farm. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr.*, **108**, 210–213.
- PATON D.J., SANDS J.J., LOWINGS J.P., SMITH J.E., IBATA G. & EDWARDS S. (1995). A proposed division of the pestivirus genus into subgroups using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assays and genetic sequencing. *Vet. Res.*, **26**, 92–109.
- RIDPATH J.F. & BOLIN S.R. (1997). Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res.*, **50**, 237–243.
- THABTI F., FRONZAROLI L., DLISSI E., GUIBERT J.M., HAMMAMI S., PEPIN M. & RUSSO P. (2002). Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.*, **33**, 35–45.
- THUR B., HILBE M., STRASSER M. & EHRENSPERGER F. (1997). Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1371–1375.
- VALDAZO-GONZALEZ B., ALVAREZ-MARTINEZ M. & SANDVIK T. (2007). Genetic and antigenic typing of border Disease virus isolates in sheep from the Iberian peninsula. *Vet. J.*, **174**, 316–324.
- VAN RIJN P.A., VAN GENNIP H.G.P., LEENCLERSE C.H., BRUSCHKE C.J.M., PATON D.J., MOORMANN R.J.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1997). Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2 *Virology*, **237**, 337–348.
- VANTSIS J.T., BARLOW R.M., FRASER J. & MOULD D.L. (1976). Experiments in border disease VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**, 111–120.
- VANTSIS J.T., RENNIE J.C., GARDINER A.C., WELLS P.W., BARLOW R.M. & MARTIN W.B. (1980). Immunisation against Border disease. *J. Comp. Path.*, **90**, 349–354.
- VILCEK S. & NETTLETON P.F. (2006). Pestiviruses in wild animals *Vet. Microbiol.*, **116**, 1–12.
- VILCEK S., NETTLETON P.F., PATON D.J. & BELAK S. (1997). Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **78**, 725–735.
- WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1988). Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated virus. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 143–148.
- WENSVOORT G., TERPSTRA C. & DE KLUYVER E.P. (1989). Characterisation of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.
- WILLOUGHBY K., VALDAZO-GONZALEZ, B., MALEY M., GILRAY J. & NETTLETON P.F. (2006). Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. *J. Virol. Methods*, **132**, 187–194.

*
* *

ПРИМЕЧАНИЕ: документ впервые принят в 1996 году.
Последнее обновление принято в 2017 году.