

ГЛАВА 3.8.3.
КЛАССИЧЕСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ
(холера свиней)
(ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ КЛАССИЧЕСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ)

РЕЗЮМЕ

Классическая чума свиней (КЧС), в англоязычной литературе также называемая холерой свиней, является контагиозной вирусной болезнью свиней, в том числе диких кабанов. Вызывающий ее вирус относится к роду Pestivirus семейства Flaviviridae и имеет близкое родство с вирусами – возбудителями вирусной диареи крупного рогатого скота и пограничной болезни овец. Вирус КЧС (ВКЧС) имеет только один серотип.

Болезнь может протекать в острой, подострой, хронической форме, иметь позднее начало или латентное течение, в зависимости от разновидности вируса и характеристик животного-хозяина, из которых наибольшее значение имеет возраст животных, вирулентность вируса и время инфицирования (до или после рождения). У взрослых свиней признаки заболевания обычно менее тяжелые, чем у молодых животных, и вероятность выживания больше. У супоросных свиноматок вирус может проникать через плаценту к плоду. Внутриматочное инфицирование штаммами вируса с умеренной или низкой вирулентностью может приводить к тому, что называют синдромом «свиноматки-носительницы», с последующей гибелью плодов до рождения или вскоре после рождения, рождением больных поросят или внешне здоровых, но инфицированных. Вспышка КЧС у домашних свиней имеет серьезные последствия для торговли свиньями и продукцией свиноводства.

Высокая изменчивость клинической картины КЧС исключает возможность постановки диагноза только на основании клинических и гистопатологических признаков. Поэтому для постановки точного диагноза необходимо использование лабораторных методов. Для диагностики КЧС у живых свиней методами выбора являются выявление вирусной нуклеиновой кислоты в цельной крови с антикоагулянтом и антител в сыворотке, а в случае павших животных наиболее подходящими методами являются выявление вируса, вирусной нуклеиновой кислоты или антигена в образцах органов.

Идентификация возбудителя: *Выделение ВКЧС следует проводить на клеточных линиях почек свиней (PK-15, SK-6) или других перmissive для ВКЧС клеточных линий. Культуры, полученные из источников, не содержащих Pestivirus (и желательно других контаминантов, таких как микоплазмы, цирковирус свиней), изучают на предмет роста вируса с помощью иммунофлуоресцентных или иммунопероксидазных методов; изоляты с положительной реакцией должны быть затем охарактеризованы с помощью частичного секвенирования генов или, если этот метод нет возможности использовать, с использованием моноклональных антител (МАТ). В настоящее время для идентификации нуклеиновой кислоты ВКЧС получили международное признание методы полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, которые используются во многих лабораториях как для выявления возбудителя, так и для его дифференциации от других пестивирусов. Для выявления антигена КЧС может использоваться прямая реакция иммунной флуоресценции (РИФ) на криостатных срезах органов больных свиней. Для определения того, обусловлена флуоресценция антигенами вируса КЧС или других вирусов рода Pestivirus, используется набор МАТ. Твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) по методу «антигенной ловушки» также полезен для скрининга, но его нельзя использовать для исследования отдельных животных.*

Серологические реакции: *Выявление вирусоспецифических антител особенно полезно в случае стада с подозрением на инфицирование ВКЧС не позже чем за 21 день до анализа.*

Серологические реакции также ценны для мониторинга и для изучения частоты заболевания и необходимы, если страна желает международного признания как свободная от данного заболевания при отсутствии вакцинации.

Поскольку у свиней иногда наблюдается антитела к другим пестивирусам, обладающие перекрестной реактивностью с ВКЧС, за скрининговыми исследованиями должны следовать подтверждающие исследования, специфичные для ВКЧС. Некоторые методы твердофазного ИФА относительно специфичны для ВКЧС, но безусловным методом выбора для дифференциации является сравнительная реакция нейтрализации, в которой сравнивают нейтрализующий титр антител к различным изолятам *Pestivirus*.

Требования к вакцинам: Вакцины против КЧС основаны на живом вирусе, аттенуированном путем пассажа на культурах клеток или путем использования видов животных-хозяев, не относящихся к семейству *Suidae*. Производство таких вакцин, содержащих аттенуированный живой вирус (АЖВ), основано на системе посевных серий, валидированной в отношении подлинности вируса, стерильности, чистоты, безопасности, стабильного отсутствия передачи вируса, иммуногенности. Если ВКЧС используется для производства вакцины или для исследований с заражением, предприятие должно соответствовать требованиям МЭБ для соответствующей группы биобезопасности, определенной на основе оценки риска.

Эффективные инактивированные традиционные цельновирионные вакцины отсутствуют. В отличие от традиционных АЖВ вакцин, могут появиться «маркерные вакцины», относящиеся к новому поколению АЖВ и способные вызывать образование антител, которые можно отличить от антител, образующихся при полевой инфекции, при использовании соответствующих диагностических методов. Зарегистрированная в настоящее время «маркерная вакцина» основана на субъединице основного гликопротеина оболочки (субъединицы E2) ВКЧС, эту вакцину получают с использованием клеток насекомых и метода рекомбинантной ДНК.

А. ВВЕДЕНИЕ

Вирусы, вызывающие классическую чуму свиней (КЧС), вирусную диарею крупного рогатого скота (BVD) и пограничную болезнь овец (BD), принадлежат к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* и являются близкородственными между собой, как в отношении антигенов, так и в отношении структуры. Клинические признаки и поражения, отмечающиеся при вскрытии у свиней, пораженных КЧС, очень изменчивы, что обусловлено как особенностями вирусов, так и характеристиками животного-хозяина. Кроме того, (внутриутробное) инфицирование поросят пестивирусами жвачных животных иногда приводит к клиническому заболеванию, неотличимому от КЧС (Terpstra, Wensvoort, 1988; Vannier, Carnero, 1985; Wensvoort, Terpstra, 1988). Недавно был представлен обзор этого заболевания (Moennig *et al.*, 2013).

КЧС поражает иммунную систему, основной характерной чертой является генерализованная лейкопения, которая часто может отмечаться до появления лихорадки. Иммуносупрессия может приводить к сопутствующим инфекциям, которые могут маскировать клиническую картину.

Основными признаками заболевания во всех возрастных группах являются пирексия, скучивание животных, отсутствие аппетита, вялость, слабость, конъюнктивит и запор с последующей диареей. Кроме того, у животных могут наблюдаться шатающаяся походка, атаксия или конвульсии. Через несколько дней после появления клинических признаков могут развиваться петехиальные кровоизлияния или красные пятна на ушах, животе и внутренней поверхности бедер. Животные с острым заболеванием погибают в течение 1–4 недель. Внезапная смерть в отсутствие клинических признаков заболевания не симптоматична для КЧС.

В некоторых случаях, в зависимости от возраста и состояния животного, а также конкретного штамма вируса, может развиваться подострое или хроническое заболевание,

продолжающееся в течение нескольких недель или даже месяцев. Хроническое заболевание ведет к замедлению роста, анорексии, периодической пирексии и диарее.

Врожденная устойчивая инфекция может не проявляться в течение нескольких месяцев и быть ограничена лишь несколькими поросятами в стаде, но может быть поражено и большее количество животных. Клинические признаки неспецифичны: истощение при отсутствии пирексии. Хронические и устойчивые инфекции всегда ведут к гибели животного. Падеж в стаде может несколько превышать ожидаемый уровень.

В острых случаях макроскопические поражения могут быть незначительными или отсутствовать. В типичных случаях лимфатические узлы увеличены и имеют красные пятна, наблюдаются кровоизлияния на серозных и слизистых оболочках в области кишечника. Может наблюдаться инфаркт селезенки. В подострых и хронических случаях на слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта, надгортанника и гортани, помимо вышеописанных поражений, могут отмечаться некротические или «узелковые» язвы.

Результаты гистопатологического исследования не патогномичны. Поражения могут включать паренхиматозную дегенерацию лимфатической ткани, пролиферацию клеток интерстициальной ткани сосудов и негнойный менингоэнцефаломиелит, с или без экссудации сосудов.

Опубликован полезный критический обзор диагностики КЧС и вакцинации, основанный на авторитетных источниках (Blome *et al.*, 2006), в котором, помимо общих указаний, представлена информация по валидации и научной экспертизе применения ряда коммерческих продуктов в этих областях.

Известный риск инфицирования человека вирусом КЧС отсутствует. Есть высокий риск распространения вируса из лаборатории, и меры биобезопасности должны определяться на основе анализа риска в соответствии с главой 1.1.4. *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*. Страны, в которых отсутствуют соответствующим образом оборудованные лаборатории, должны отсылать образцы в референтную лабораторию МЭБ.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики классической чумы свиней и их целевое назначение

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Серологический статус для надзора за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Выделение вируса	-	+	-	+++	-	-
ПЦР	+	+	++	+++	++	-
Твердофазный ИФА (антиген)	++	+	+	+	-	-
РИФ	-	-	+	+	-	-
Выявление иммунной реакции						
Твердофазный ИФА (антитела)	+++	+++	+++	-	+++	+++

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

НВ (FAVN или NPLA)	+	+++	++	++	+++	+++
-------------------------------	---	-----	----	----	-----	-----

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами; - = не подходит для данной цели.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; НВ = нейтрализация вируса;

РИФ = реакция иммунной флюоресценции.

Изменчивость клинических признаков и макроскопических поражений не дают возможности постановки однозначного диагноза. На острую форму КЧС похожи другие вирусные болезни, такие как африканская чума свиней, синдром дерматита и нефропатии поросят (СДНП) и синдром послеотъемного мультисистемного истощения поросят (СПМИП), тромбоцитопеническая пурпура и различные септицемические заболевания, в том числе сальмонеллез (в особенности вызванный *Salmonella choleraesuis*), рожа, пастереллез, актинобациллез (вызванный *Actinobacillus suis*) и инфекции *Haemophilus parasuis*. На деле эти бактерии часто вызывают сопутствующие инфекции, и выделение этих патогенов может скрыть реальную причину заболевания, вирус КЧС (ВКЧС). Аналогично, сопутствующий СДНП может привести к невыявлению исходной инфекции КЧС.

Поэтому предположительный диагноз, основанный на клинических признаках и результатах вскрытия, должен быть подтвержден лабораторными исследованиями. Поскольку пирексия является одним из первых признаков КЧС и сопровождается вирусемией (Derper *et al.*, 1994), методом выбора для выявления инфицированных стад на ранней стадии является обнаружение вируса или вирусной нуклеиновой кислоты в цельной крови с добавлением гепарина или этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или в тканях, забранных у животных с повышенной температурой тела. Это тем более необходимо с учетом серьезных последствий вспышки КЧС для торговли свиньями и продукцией свиноводства.

Лабораторные методы диагностики КЧС имеют целью выявление вируса, вирусной нуклеиновой кислоты или вирусных антигенов, или же выявление специфических антител. Следует проводить отбор проб с учетом органов-мишеней и риска, случайный отбор проб применяется только в случаях, когда клинические признаки заболевания отсутствуют. Для повышения чувствительности выявления вируса, вирусного антигена или нуклеиновой кислоты следует забирать образцы в основном от животных с клиническими признаками заболевания и повышенной температурой тела. Для выявления антител следует в первую очередь исследовать животных, выздоровевших после болезни, или животных, контактировавших с инфицированными или больными животными.

Для правильной интерпретации результатов исследования осматривающий животных ветеринарный врач должен обращать особое внимание на одновременное и групповое появление двух или более преимущественных признаков заболевания из перечисленных выше. При первых подозрительных случаях первоначальные положительные результаты исследования должны быть подтверждены с использованием второго метода исследования.

Антитела образуются на третьей неделе заболевания и сохраняются у выживших животных в течение нескольких лет или даже пожизненно (за исключением хронических случаев). Образцы для выявления антител забирают в обычные (не гепаринизированные) пробирки от выздоравливающих свиней и контактировавших с ними животных. Все методы и протоколы должны быть валидированы в соответствующей лаборатории, и лаборатория должна доказать, что она способна проводить анализы, которые она использует для диагностических целей, с удовлетворительными результатами. Валидация должна проводиться в соответствии со стандартом валидации МЭБ (см. главу 1.1.6.

Принципы и методы валидации диагностических наборов для анализа инфекционных заболеваний).

1. Идентификация возбудителя

1.1. Выделение вируса

Выделение вируса в культурах клеток является более чувствительным, но более медленным методом диагностики КЧС, чем иммунофлуоресценция или изучение замороженных срезов. Можно использовать препараты органов, препараты лейкоцитов или образцы цельной крови. Выделение лучше всего проводить на быстро делящихся клетках РК-15, посеянных на покровные стекла одновременно с 2% суспензией миндалин в ростовой среде. Можно использовать другие линии клеток свиней, но необходимо продемонстрировать, что они не менее чувствительны, чем клетки РК-15, для выделения ВКЧС, и они не должны содержать пестивирусов и антител к пестивирусу. Обычно желательно использовать более одной линии клеток свиней для посева, чтобы повысить возможность получения положительного результата. Поскольку рост вируса не оказывает цитопатического действия, присутствие вируса необходимо продемонстрировать с использованием окрашивания иммунной меткой, что можно проводить после одного или двух пассажей вируса. Это можно осуществить путем изучения культур на предмет флуоресцирующих локусов в РИФ после 24–72 ч или путем иммунопероксидазного окрашивания после 3–4 дней инкубации. NB: В исследование всегда необходимо включать положительный и отрицательный контроли.

Миндалины являются наиболее подходящим органом для выделения вируса от павших или забитых с диагностическими целями свиней. Вместо этого или в дополнение к этому можно также использовать селезенку, почки, подвздошную кишку или лимфатические узлы.

Сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота (СЭКРС), используемая в диагностических исследованиях, всегда должна быть свободна от пестивирусов и антител к пестивирусу. Полагаться на заявления производителей может быть недостаточно, по этой причине перед использованием в диагностических анализах рекомендуется проверять каждую серию СЭКРС на наличие пестивирусов и антител против пестивируса.

1.1.1. Выделение вируса – методика 1

- i) Готовят исходный раствор глутамин и антибиотиков 100-кратной концентрации: растворяют глутамин (2,92 г) в 50 мл дистиллированной воды (раствор А) и стерилизуют фильтрованием. Каждый из следующих антибиотиков растворяют в 5–10 мл стерильной дистиллированной воды: пенициллин (10^6 международных единиц [МЕ]); стрептомицин (1 г); микостатин (5×10^5 ед.); полимиксин В (15×10^4 ед.) и канамицин (1 г). Соединяют эти растворы (раствор В). Асептически смешивают растворы А и В, объем доводят до 100 мл стерильной дистиллированной водой и хранят в виде аликвот по 5 мл при температуре -20°C . Точное содержание антибиотиков не имеет решающего значения при условии стерильности и отсутствия воздействия на клетки.
- ii) Разрезают 1–2 г ткани (образец органа объемом около 1 см^3) на мелкие кусочки и с использованием ступки и пестика или другого устройства растирают их в небольшом объеме культуральной среды со стерильным песком до однородной пасты. Вместо этого можно использовать соответствующую дробилку или автоматический гомогенизатор при 4°C . (Внимание: высокие скорости могут нагревать образец и влиять на вирус!)
- iii) Получают 20% (масса/объем) суспензию путем добавления сбалансированного солевого раствора Хенка (ССР) или минимальной поддерживающей среды Хенка (МПС); на каждые 10 мл суспензии добавляют 1 мл исходного раствора глутамин и антибиотиков. Эту смесь при комнатной температуре хранят в течение 1 ч.

- iv) Центрифугируют при 1000 или 2500 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость используют для посева в культуры клеток. В случае цитотоксического действия параллельно можно использовать разведение 1/100. При необходимости можно провести стерильное фильтрование с использованием шприц-фильтров (0,45 мкм, затем 0,22 мкм).
- v) Монослой РК-15 трипсинизируют, клеточную суспензию центрифугируют при 160 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а осадок ресуспендируют в ростовой среде до концентрации примерно 2×10^6 клеток/мл (МПС Игла с солями Игла; 5% сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота без пестивирусов жвачных животных и антител против пестивируса; 0,2 мл исходного раствора глутамина и антибиотиков на 10 мл суспензии клеток). Ориентировочно одна колба объемом 75 см² даст около 50 мл суспензии клеток соответствующей концентрации. Она обычно содержит около $8,5 \times 10^6$ клеток. Вместо этого можно использовать протокол без центрифугирования: Ростовую среду монослоя клеток РК-15 отбрасывают и промывают клетки один или два раза 5 мл скорректированного раствора трипсин/версен (ATV) (5 мл ATV на колбу емкостью 250 мл). ATV отбрасывают и заменяют свежим ATV (2 мл ATV на колбу емкостью 250 мл). Колбу инкубируют при 37°C в течение 15 мин или пока клетки не отделятся. Затем ее заполняют средой для культуры клеток, содержащей 5% СЭКРС (8 мл среды на колбу емкостью 250 мл) и ресуспендируют клетки.
- vi) Или:
Посев суспензии: смешивают 9 частей суспензии клеток (из этапа v) и 1 часть надосадочной жидкости (из этапа iv) и засевают 1,0–1,5 мл в 6–8 пробирок Лейтона с покровными стеклами или в другие соответствующие колбы или чашки для культуры клеток. В 3 пробирки высевают 1,0–1,5 мл только суспензии клеток в качестве контроля. После завершения посева образца в 3 пробирки высевают ВКЧС в качестве положительного контроля. Необходимо предпринимать необходимые предосторожности для предотвращения перекрестной контаминации этой суспензией с содержанием известного вируса. Также должны быть получены отрицательные культуры. Инкубируют при 37°C.
Или:
Посев предварительно сформированных монослоев: для каждой ткани высевают 1,0–1,5 мл суспензии клеток (приготовленной согласно этапу v) в 6–8 пробирок Лейтона с покровными стеклами или в другие соответствующие колбы или чашки для культуры клеток. Инкубируют при 37°C в течение не менее чем 4 ч и не более чем 36 ч (до достижения степени смыкания 50–80%). Затем сливают среду и высевают 0,2 мл надосадочной жидкости (из этапа iv), инкубируют в течение 1–2 ч при 37°C, один раз промывают ФСБМ (ФСБ без Са/Мg), заливают 1 мл ростовой среды и инкубируют при 37°C.
- vii) Через 1, 2 и 3 дня после посева две культуры, а также положительный и отрицательный контроль дважды промывают по 5 мин ССР Хенка, МПС Хенка или ФСБ и фиксируют. Фиксация клеток проводится 100% ацетоном (квалификации «чистый для анализа») в течение 5 мин для культур клеток, выращенных на стеклянных поверхностях.
- viii) После фиксации проводится окрашивание прямым или непрямым анти-ВКЧС конъюгатом в соответствующем рабочем разведении как описано в разделе В.1.2. После трехкратной промывки ФСБ по 5 мин каждый раз культуры на покровных стеклах заключают в 90% забуференный карбонатом/бикарбонатом глицерин с pH > 8,0 и изучают на предмет флуоресцентных локусов. Вместо пробирок Лейтона можно использовать 6-луночные планшеты с покровными стеклами. Для выделения вируса можно также использовать культуры, выращенные на титрационных планшетах с плоским дном или планшетах М24. В

таком случае фиксацию и окрашивание на планшетах проводят как описано ниже для нейтрализующего пероксидазного анализа (NPLA; раздел В.2.1).

- ix) Если 2% суспензия миндалин оказалась токсичной для клеток, исследование следует повторить с использованием большего разведения или другого органа. Использование метода с применением предварительно сформированных монослоев (описан выше) поможет избежать этой проблемы.

1.1.2. Выделение вируса – методика 2

Цельная кровь (с добавлением гепарина или ЭДТА) свиней с клиническими признаками заболевания пригодна для ранней диагностики КЧС. Может использоваться фракция лейкоцитов или другие компоненты, но из соображений простоты более рациональным и поэтому предпочтительным является использование цельной крови (De Smit *et al.*, 1994).

Методика следующая:

- i) Образец цельной крови замораживают при -20°C и оттаивают на водяной бане при 37°C для лизиса клеток.
- ii) Высевают 300 мкл гемолизированной крови на монослой РК-15, выращенный до степени смыкания $50\text{--}80\%²$ на планшете М24 или в пробирках Лейтона с покровными стеклами, и оставляют для абсорбции в течение 1–2 ч при 37°C . Для каждого образца культуры всегда делают в двух повторностях.
- iii) Удаляют инокулят, однократно промывают монослой ССР Хенка или МПС Хенка или ФСБМ, и добавляют свежую ростовую среду.
- iv) После дальнейшей инкубации в течение 3–4 дней при 37°C в инкубаторе с CO_2 планшеты промывают, фиксируют и окрашивают как описано ниже для NPLA, с использованием на каждом этапе объема 300 мкл для компенсации большей поверхности клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ: Этот метод менее чувствительный, чем традиционное выделение вируса, в случае выявления острой формы КЧС.

1.1.3. Выделение вируса – методика 3

Для повышения чувствительности выделение вируса можно проводить с использованием двух пассажей:

- i) В пробирку для культивирования клеток высевают 200–300 мкл препарата органа или лизата крови (см. выше). Культуры всегда готовят в двух повторностях.
- ii) Культуры клеток инкубируют при 37°C в течение 1–2 ч и два раза промывают ФСБМ.
- iii) Культуры инкубируют в течение 72 ч при 37°C в инкубаторе с CO_2 . МПС Игла с 10% СЭКРС является идеальной средой для роста вируса. Можно проводить одновременный посев, если образец свежий и цитотоксическое действие маловероятно.
- iv) Пробирки с культурой клеток или планшеты замораживают при -80°C не менее чем на 1 ч, а затем оттаивают при комнатной температуре.
- v) При использовании пробирок для культуры клеток пробирки центрифугируют в течение 10 мин при 778 g.
- vi) Инкубируют 200–300 мкл надосадочной жидкости в течение 1–2 ч в лунке планшета на несколько чашек или пробирке Лейтона как описано выше.
- vii) Пробирки или планшеты с культурой клеток промывают ФСБМ, наполняют средой для культуры клеток и инкубируют в течение 72–96 ч в инкубаторе с CO_2 .
- viii) Клетки фиксируют и окрашивают как описано в разделе В.2.1.

Если есть подозрение, что данный изолят отличается медленным ростом, можно провести второй пассаж в пробирке для культуры клеток, что приведет к третьему пассажию на чашке для культивирования.

² Одновременный посев, хотя и дает несколько большую чувствительность, менее пригоден, поскольку антикоагулянт может влиять на адгезию клеток к поверхности.

Всегда необходимо готовить положительный и отрицательный контроли и обрабатывать их аналогичным образом.

1.1.4. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Уже описано и находится в стадии разработки много методов ПЦР ОТ (McGoldrick *et al.*, 1998). С использованием метода ПЦР ОТ инфицированных животных можно выявить на ранних этапах в инкубационный период и в течение более длительного периода времени в случаях выздоровления животных. С помощью ПЦР ОТ обнаруживается только нуклеиновая кислота вируса, и положительные результаты можно получить в случаях, когда выделение вируса или другие методы дали отрицательные результаты. Таким образом, ПЦР ОТ обладает большей чувствительностью, чем другие методы (такие как метод «антигенной ловушки» твердофазный ИФА и РИФ).

По причине высокой скорости и чувствительности метод ПЦР ОТ пригоден для скрининга и подтверждения случаев подозрения на заболевание и в настоящее время используется во многих странах и в Европейском союзе (ЕС) (European Commission, 2002). Однако важно иметь в виду, что могут отмечаться ложноположительные результаты в результате лабораторной контаминации, а также ложноотрицательные результаты из-за наличия в образцах ингибиторов. Поэтому любые положительные результаты при первичных вспышках всегда необходимо подтверждать с использованием других методов. Обязательно использовать достаточное количество положительных и отрицательных контролей при каждом проведении исследования; кроме того, настоятельно рекомендуется делать внутренние контроли. Подробную информацию о методе ПЦР см. в главе 1.1.6. *Принципы и методы валидации диагностических наборов для анализа инфекционных заболеваний.*

Для проведения исследования можно использовать образцы крови и сыворотки, а также органы животных и надосадочную жидкость культуры клеток; данный метод успешно используется в случае вспышек.

Выделение РНК является критическим этапом ПЦР ОТ. Риск повреждения целостности РНК особенно высок перед и после экстрагирования. Поэтому необходимо обращать особое внимание на обработку проб перед экстрагированием РНК и хранение выделенной РНК, поскольку эти манипуляции влияют на качество полученной РНК и результаты исследования. Описаны разные методы выделения РНК, и в продаже имеется широкий ассортимент наборов для экстрагирования. Необходимо также провести валидацию выделения РНК в лаборатории.

Описано несколько протоколов традиционной ПЦР и ПЦР в формате реального времени (Hoffmann *et al.*, 2005; McGoldrick *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 2000b; Risatti *et al.*, 2003; 2005), подходящий протокол можно найти в литературе или получить в референтных лабораториях МЭБ по КЧС (см. таблицу в части 4 данного Руководства МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных). Оценку результатов ПЦР ОТ можно проводить с использованием электрофореза в агарозном геле (стандартная ПЦР ОТ) или в формате реального времени (RT-qПЦР). Любой используемый метод ПЦР ОТ должен быть тщательно валидирован в каждой отдельной лаборатории, и до его использования для диагностики в данной лаборатории должно быть показано, что этот метод пригоден для поставленных целей. Любой используемый метод ПЦР ОТ должен иметь не меньшую чувствительность, чем выделение вируса. Метод RT-qПЦР широко используется и демонстрирует устойчивые результаты при международном межлабораторном сравнении (Hoffmann *et al.*, 2005).

В принципе, возможно объединение образцов, но должно быть продемонстрировано, что чувствительность не ниже, чем чувствительность при выделении вируса из отдельных образцов. Объединение образцов должно быть надлежащим образом валидировано перед его использованием в каждой отдельной лаборатории.

Контроль качества является важным моментом при диагностике с помощью ПЦР, и решающее значение имеет предотвращение лабораторной контаминации.

1.1.5. Молекулярная эпидемиология и генетическое типирование

Молекулярная эпидемиология КЧС основана на сравнении генетических различий между изолятами вируса. Наиболее простым способом получения данных о последовательностях для таких сравнений является амплификация РНК ВКЧС с помощью ПЦР ОТ с последующим секвенированием нуклеотидов. Для молекулярных эпидемиологических исследований может использоваться много разных участков генома ВКЧС (Paton *et al.*, 2000a). Два участка хорошо изучены, по ним получено много данных по последовательностям нуклеотидов, с которыми можно сравнивать данные новых изолятов. Один из этих участков расположен в 5'-нетранслируемой части (5'NTR) генома (150 нуклеотидов), а другой – в гене E2 основного гликопротеина (190 нуклеотидов). В общем, используемый метод включает экстрагирование вирусной РНК из клинических образцов или культур клеток, инфицированных ВКЧС при низком уровне пассажей, с проведением ПЦР ОТ для амплификации одной или обеих мишеней 5'NTR или гена E2, с последующим определением последовательности нуклеотидов продуктов и сравнения с имеющейся в базах данных информацией о последовательностях (Greiser-Wilke *et al.*, 1998; Lowings *et al.*, 1996). База данных по этим последовательностям имеется в референтной лаборатории МЭБ по КЧС в Германии. Недавно полученные результаты по анализу последовательностей нуклеотидов других пестивирусов подчеркивают необходимость анализа нескольких участков для точного типирования штаммов с помощью этого метода (Becher *et al.*, 2003; Hurtado *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009; Vilcek *et al.*, 2010). Изоляты ВКЧС, выделенные при первичных вспышках, должны быть отправлены в референтную лабораторию МЭБ для изучения молекулярной эпидемиологии. Сначала следует обратиться в принимающую лабораторию и перед отправкой материала получить разрешение на ввоз.

1.2. Иммунологические методы

1.2.1. Реакция иммунной флюоресценции

Реакция иммунной флюоресценции (РИФ) представляет собой быстрый метод, который можно использовать для выявления антигена ВКЧС в криостатных срезах миндалин, селезенки, почек, лимфатических узлов или дистальных отделов подвздошной кишки. Ткани следует забирать от нескольких (с повышенной температурой тела и/или больных) животных (Boima *et al.*, 2001) и транспортировать без консервантов в охлажденном, но не замороженном, виде. Криостатные срезы окрашивают непосредственно анти-КЧС иммуноглобулином, конъюгированным с флуоресцентным маркером, таким как флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), или непрямым способом с использованием вторичного флуоресцентного конъюгата и изучают с помощью флуоресцентной микроскопии. На первой стадии заболевания лучше использовать ткань миндалин, поскольку они в первую очередь поражаются вирусом, независимо от пути инфицирования (Ressang, 1973). В подострых и хронических случаях вирус часто выявляется в подвздошной кишке, которая иногда бывает единственным органом, в тканях которого наблюдается флуоресценция.

Отрицательный результат РИФ не является основанием для полного исключения инфекции КЧС. Если подозрение на КЧС остается, следует забрать другие образцы или использовать полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ) или провести выделение вируса в культуре клеток. В некоторых случаях на терминальной стадии болезни нейтрализующие антитела могут маскировать положительную реакцию.

Существует относительно высокий риск ложных (положительных и отрицательных) результатов, если РИФ используется лабораториями, не очень хорошо знакомыми с данным методом. Поэтому РИФ следует проводить только в лабораториях, которые имеют опыт использования данного метода, проводят такой анализ на рутинной основе и умеют правильно интерпретировать флуоресценцию.

а) Методика

Каждая исследуемая серия образцов органов должна включать положительный и отрицательный контроль. При непрямом введении метки должен также присутствовать инфицированный контрольный срез, обрабатываемый без инкубации первых антител. Этот контрольный срез может быть получен заранее и храниться после фиксации ацетоном в течение 2–3 лет при -70°C до использования.

- i) Отрезают кусок миндалина, селезенки, почки и подвздошной кишки размером примерно $1 \times 1 \times 0,5$ см и монтируют его в веществе для криозаливки или дистиллированной воде на столике криостата.
- ii) Примораживают кусок органа к столику криостата. Температура замораживания должна составлять от -15 до -20°C . Идеальным вариантом является шоковое замораживание ткани в n-гептане, охлажденном жидким N_2 .
- iii) Делают срезы толщиной не более 4–8 мкм и монтируют их на обезжиренных покровных стеклах. Целесообразно маркировать эти покровные стекла посредством усечения угла и монтировать их так, чтобы этот угол располагался одинаково (например, вверху справа).
- iv) Готовят несколько покровных стекол для каждого образца ткани.
- v) Сушат в течение 20 мин при комнатной температуре.
- vi) После сушки фиксируют смонтированные срезы в течение 10 мин в ацетоне (квалификации «чистый для анализа») при -20°C или сушат на воздухе в течение 20 мин при 37°C .
- vii) Кратко погружают срезы в фосфатно-солевой буфер (ФСБ), удаляют избыток жидкости папиросной бумагой и помещают их (усеченный угол вверху справа) на рамку во влажную камеру для инкубации.
- viii) Наносят анти-КЧС иммуноглобулин в рабочем разведении (разведение в ФСБ) на весь срез и инкубируют в темной закрытой камере в течение 30 мин при 37°C . Затем проверяют, что раствор конъюгата не испарился и что ткани не высохли.
Если требуется вторичный конъюгат ФИТЦ, промывают срез пять раз по 2 мин в ФСБ при комнатной температуре, затем добавляют конъюгат ФИТЦ в рабочем разведении и инкубируют как описано ранее.
- ix) Промывают срезы пять раз по 2 мин (или три раза по 5 мин) в ФСБ при комнатной температуре.
- x) Кратко погружают срезы в бидистиллированную воду (растворитель).
- xi) При необходимости проводят контрастирующее окрашивание эвансом голубым в течение 30 с.
- xii) Удаляют остаточную жидкость, касаясь покровным стеклом папиросной бумаги, и монтируют покровное стекло (срез должен находиться между покровным и предметным стеклом) в монтажном буфере на предметном стекле для микроскопа.
- xiii) Удаляют избыток монтажной жидкости папиросной бумагой и изучают срезы на предмет флуоресценции с использованием УФ-микроскопа.

На имеющих положительную реакцию на КЧС срезах наблюдается яркая флуоресценция в цитоплазме инфицированных клеток. На срезах миндалин особенно заметна флуоресценция в эпителии крипт. На срезах почек флуоресценция особенно сильная в проксимальных и дистальных канальцах коры почек и собирающих протоках в мозговом веществе почки. В подвздошной кишке флуоресценция особенно сильно выражена в эпителиальных клетках либеркюновых кишечных желез, в то время как в селезенке реакция более диффузная, с концентрацией лимфоидных клеток в периартериальной лимфоидной ткани (PALS).

Рекомендуется использовать анти-ВКЧС гамма-глобулины, приготовленные из поликлональных антител против ВКЧС, полученных от не имеющих специфических патогенов свиней. Это обеспечивает обнаружение минорных вариантов вируса, но при

этом есть тот недостаток, что нельзя различить антигены разных пестивирусов. Таким образом, свиньи, инфицированные другими пестивирусами, могут дать положительный результат. Для дифференциации ВКЧС от других пестивирусов, особенно в свободных от ВКЧС регионах, положительные в РИФ образцы следует изучать в двух повторностях с использованием моноклональных антител (МАТ), которые позволяют дифференцировать ВКЧС и другие пестивирусы (особенно вирусы вирусной диареи крупного рогатого скота и пограничной болезни овец). Или же для подтверждения диагноза следует подождать результатов ПЦР ОТ (с последующим генетическим типированием) или выделения вируса в культуре клеток с последующим типированием с использованием МАТ.

Вакцинные штаммы аттенуированного живого вируса (АЖВ) размножаются главным образом в регионарных лимфатических узлах и в эпителии крипт миндалин. Свиньи, вакцинированные штаммами АЖВ, могут давать положительный результат в РИФ через 2 недели после вакцинации (Ogawa *et al.*, 1973; Terpstra, 1978). ПЦР ОТ с последующим секвенированием нуклеиновой кислоты ампликонов ПЦР ОТ позволяет дифференцировать полевые изоляты и вакцинные штаммы ВКЧС.

Рабочее разведение конъюгатов (не менее 1/30) должно обеспечивать максимальную яркость флуоресценции с минимальным фоновым уровнем. Исследование должно проводиться только на образцах от недавно умерших животных, разложение и контаминация бактериями часто могут приводить к высокой фоновой флуоресценции.

1.2.2. Иммунопероксидазный метод для дифференциации пестивирусов с помощью моноклональных антител

Использование набора из трех МАТ, конъюгированных или с пероксидазой хрена (HRPO), или с флуоресцентным маркером, или используемых в комбинации с антимышиным конъюгатом и обеспечивающих специфическую детекцию всех полевых штаммов ВКЧС, вакцинных штаммов ВКЧС и других пестивирусов, соответственно, должно позволить безошибочно дифференцировать полевые и вакцинные штаммы ВКЧС, с одной стороны, и ВКЧС и другие пестивирусы, с другой (Edwards *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1986; 1989b). Условием является способность МАТ против ВКЧС различать все полевые штаммы, и способность антивакцинных МАТ различать все вакцинные штаммы, используемые в данной стране. *Нет таких индивидуальных МАТ, которые бы избирательно реагировали со всеми другими пестивирусами* (Edwards *et al.*, 1991). Использование МАТ для дифференциации вакцинного штамма КЧС не обязательно в областях, где не проводилась вакцинация. Поликлональный анти-КЧС иммуноглобулин, конъюгированный с HRPO, служит положительным контролем. Следует соблюдать осторожность при использовании данных, полученных с использованием одного типа МАТ, в качестве единственного подтверждения принадлежности изолята к КЧС. Следует запросить информацию по подходящим МАТ и их поставщиках у референтных лабораторий МЭБ по КЧС.

В каждую исследуемую серию образцов органов должны быть включены положительный и отрицательный контроль. В случае непрямого введения метки следует также включить в исследование инфицированный контрольный срез, обрабатываемый без инкубации первого антитела. Контрольные срезы можно приготовить заранее и хранить после фиксации ацетоном в течение 2–3 лет при -70°C до использования.

а) Методика

- i) Делают восемь или более криостатных срезов (4–8 мкм) миндалин, давших положительный результат в РИФ, или других давших положительный результат органов, если образцы миндалин отсутствуют (как описано выше для метода РИФ).
- ii) Помещают срезы на предметные стекла, дают высохнуть в течение 20 мин при комнатной температуре и фиксируют в течение 10 мин в ацетоне (квалификации «чистый для анализа») при -20°C и дают высохнуть на воздухе.

- iii) Готовят рабочие разведения соответствующих МАТ-пероксидазных конъюгатов в ФСБ + 0,01% твина-80 + 5% лошадиной сыворотки, рН 7,6. (можно использовать ФИТЦ-МАТ и неконъюгированные МАТ, если используется вторичный конъюгат.)
- iv) Срезы кратко погружают в ФСБ, удаляют избыток жидкости папиросной бумагой и помещают их (с усеченным углом вверх справа) на рамку во влажную камеру для инкубации.
- v) Наносят на два среза рабочее разведение соответствующих моноклональных конъюгатов, а на два среза – рабочее разведение поликлонального конъюгата (контроль).
- vi) Инкубируют в темной закрытой камере в течение 30 мин при 37°C. Затем проверяют, не испарились ли растворы и не высохли ли ткани.
- vii) Промывают срезы шесть раз в течение 10 с в ФСБ при комнатной температуре.
- viii) Окрашивают срезы свежеприготовленным раствором хромоген-субстрат³ в течение 5–15 мин при комнатной температуре.
- ix) Промывают срезы в 0,05 М ацетате натрия, рН 5,0, в дистиллированной воде и монтируют их на предметные стекла для микроскопа.
- x) Срезы изучают с помощью светового микроскопа. Темно-красное окрашивание цитоплазмы указывает на распознавание изолята вируса соответствующим конъюгатом и считается положительной реакцией.
- xi) Интерпретация результатов исследования:

Поликлональн ые антитела	Моноклональные антитела, специфичные для			Интерпретация
	штамма КЧС	вакцинного штамма КЧС	штамма BVD/BD	
+	+	-	-	Полевой штамм КЧС
+	+	+	-	Вакцинный штамм КЧС
+	-	-	+	Штамм BVD/BD
+	-	-	-	Другие виды Pestivirus [†] , не BKЧС

[†] Всегда следует учитывать возможность существования новых штаммов КЧС, и любые изоляты в случаях, когда подозрение на КЧС сохраняется, следует отсылать в референтную лабораторию МЭБ.

1.2.3. Метод «антигенной ловушки»

Для быстрой диагностики КЧС у живых свиней был разработан метод «антигенной ловушки» твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазный ИФА) для скрининга стад с подозрением на недавнее инфицирование. Твердофазный ИФА относится к сэндвич-типу, с использованием моноклональных и/или поликлональных антител против различных вирусных белков или в сыворотке, или во фракции лейкоцитов крови, или в цельной крови с антикоагулянтом; кроме того, могут использоваться

³ Раствор хромоген-субстрат

А. Исходный раствор хромогена: 0,4% 3-амино-9-этилкарбазол; N,N-диметилформамид (1 мл).

Осторожно: **ТОКСИЧНОЕ вещество**. Оба химических вещества канцерогенны и раздражают глаза, кожу и дыхательные пути.

В. 0,05 М ацетата натрия, рН 5,0; 19 мл (стерильное фильтрование через мембрану).

С. Исходный раствор субстрата (30% перекись водорода).

Растворы А и С хранят при 4°C в темноте, а раствор В – при комнатной температуре. Исходный раствор А можно хранить при 4°C в течение не менее 6 месяцев, а раствор С – в течение 1 года. Непосредственно перед использованием разводят 1 мл раствора А в 19 мл раствора В. Затем добавляют 10 мкл исходного раствора С. Хорошо размешивают и окрашивают срезы.

некоторые тест-наборы для исследования осветленных гомогенатов тканей (Derper *et al.*, 1995) или сыворотки. Этот метод относительно прост в проведении, не требует оборудования для культуры тканей, имеет возможности автоматизации и может дать результаты за 12 ч. Недостатком его является меньшая чувствительность по сравнению с выделением вируса, особенно у взрослых свиней и при слабой интенсивности заболевания или субклиническом течении, что можно компенсировать изучением всех свиней стада с подозрением на заболевание, у которых отмечены пирексия или клинические признаки заболевания. Однако следует учитывать также более низкую специфичность этих методов. Данный метод непригоден для диагностики КЧС у одного животного, его следует использовать только на уровне стада.

При любом первичном случае положительные результаты необходимо подтвердить с использованием другого метода (т.е. выделения вируса, ПЦР ОТ или РИФ).

2. Серологические реакции

Вследствие иммуносупрессивного действия ВКЧС антитела невозможно обнаружить с определенностью до прошествия не менее чем 21 дня после инфицирования. Серологические исследования, имеющие целью выявление остаточных очагов инфекции, особенно в племенных стадах, могут быть полезны на заключительных фазах эрадикации КЧС. Титры антител дают важную эпидемиологическую информацию и могут помочь в определении пути проникновения вируса.

Поскольку частота инфицирования пестивирусами жвачных животных может быть высокой, особенно в племенных стадах, могут быть полезны только те методы, которые позволяют различать антитела против КЧС и против BVD/BD. Нейтрализация вируса (НВ) и твердофазный ИФА с использованием МАТ удовлетворяют требованиям в отношении чувствительности, но положительные результаты должны быть подтверждены сравнительным исследованием НВ.

Реакция нейтрализации проводится в культурах клеток с использованием метода постоянной вирус/различные сыворотки. Поскольку ВКЧС не оказывает цитопатического действия, необходимо выявить все не нейтрализованные вирусы, после размножения, с использованием системы индикаторов. Чаще всего используемыми методами являются NPLA (Terpstra *et al.*, 1984) и иммунофлуоресцентная вируснейтрализация (FAVN) (Liess, Prager, 1976). Обе реакции могут проводиться на микротитрационных планшетах. В настоящее время предпочтение отдается NPLA, в этом случае легче интерпретировать результаты и есть то преимущество, что результаты можно получить с использованием инверсионного микроскопа, хотя грубую оценку титра можно сделать невооруженным глазом.

2.1. Реакция нейтрализации связанной пероксидазы

NPLA проводят на микротитрационных планшетах с плоским дном. Сыворотки можно сначала инактивировать в течение 30 мин при 56°C. Для целей международной торговли лучше проводить тест с исходным разведением сыворотки 1/5 (окончательное разведение 1/10). В схемах надзора в пределах страны может быть достаточно скринингового разведения 1/10 (окончательное разведение 1/20). Для обеспечения специфичности и чувствительности реакций в каждом исследовании включают соответствующие контроли.

2.1.1. Методика

- i) Разведения сыворотки в ростовой среде (МПС Игла, 5% СЭКРС и антибиотики) в объеме 50 мкл помещают в двух повторностях в лунки микротитрационного планшета. СЭКРС не должна содержать вируса BVD и антител к нему. Для каждого образца должна быть третья лунка. Эта лунка содержит сыворотку без вируса и является контролем сыворотки (на предмет цитотоксичности и/или неспецифического окрашивания).

- ii) В лунки добавляют 50 мкл суспензии вируса, разведенной в ростовой среде до концентрации около 100 TCID₅₀ (50% инфекционная доза в тканевой культуре)/50 мкл, и размещивают содержимое с помощью встряхивателя для микропланшетов в течение 20 с. Обычно используется КЧС Alfort 187 (генотип 1.1). Хотя существует только один серотип ВКЧС, рекомендуется использовать также недавно выделенные генотипы или полевые изоляты вируса, циркулирующие в данной стране или других релевантных странах, поскольку титры антител могут варьировать в зависимости от генотипа вируса, использованного в анализе.
- iii) Планшеты инкубируют в инкубаторе с CO₂ во влажной камере в течение 1 ч при 37°C.
- iv) Во все лунки добавляют 50 мкл ростовой среды, содержащей 2 × 10⁵ РК-15 клеток/мл.
- v) Проводят обратное титрование вируса и инкубируют вместе с нейтрализационным планшетом.
- vi) Оставляют клетки для роста при 37°C при 5% CO₂ до достижения сомкнутости, обычно на 3–4 дня.
- vii) Отбрасывают ростовую среду и промывают планшеты однократно в 0,15 М NaCl или ФСБ.
- viii) Удаляют жидкость с планшета, промокнув его полотенцем.
- ix) Клеточные монослои можно фиксировать и инактивировать вирус одним из следующих способов:
 - a) Планшеты инкубируют в течение 45 мин при 37°C, а затем в течение не менее чем еще 45 мин при -20°C. Планшеты вынимают из морозильной камеры, в лунки вносят 100 мкл 4% раствора параформальдегида в ФСБ и снова инкубируют в течение 5–10 мин при комнатной температуре. Параформальдегид отбрасывают и промывают планшеты 0,15 М NaCl;
или
 - b) Планшеты инкубируют при 70–80°C в течение 2–3 ч;
или
 - c) Планшеты фиксируют 80% ацетоном и инкубируют при 70–80°C в течение 1 ч;
или
 - d) Планшеты фиксируют в 20% ацетоне в ФСБ в течение 10 мин с последующей осторожной сушкой при 25–30°C в течение 4 ч. (Это можно сделать быстро с помощью фена: за 3–5 мин достигается полное высушивание, что видно по беловатому цвету клеточного монослоя.)
или
 - e) Планшеты промывают охлажденным на льду 99,9% этанолом и фиксируют 99,9% этанолом в течение 45 мин при 4°C. (Окрашивание следует проводить немедленно.)
- x) В каждую лунку (96-луночного планшета) вносят 50 мкл гипериммунной свиной антисыворотки к КЧС или МАТ, разведенных в 0,5 М NaCl, содержащем 1% твина-80 + 0,1% азида натрия, рН 7,6. Инкубируют при 37°C в течение не менее чем 15 мин. Рабочее разведение антисыворотки необходимо определить путем предварительного титрования: т.е. сыворотку с титром NPLA 1/30000 можно использовать в разведении 1/100.
- xi) Планшеты промывают пять раз в 0,15 М NaCl, содержащем 1% твина-80, рН 7,6, или ФСБ, содержащем твин, и один раз дистиллированной водой.
- xii) В каждую лунку добавляют 50 мкл противосвиного или противомышиного (по возможности) конъюгата IgG-HRPO, разведенного до рабочей концентрации в 0,5 М NaCl с 1% твина-80, рН 7,6, а затем инкубируют в течение не менее чем 15 мин при 37°C.
- xiii) Планшеты промывают пять раз 0,15 М NaCl, содержащим 1% твина-80, рН 7,6.

- xiv) Добавляют 50 мкл раствора хромоген-субстрат в каждую лунку и окрашивают в течение 15–30 мин при комнатной температуре. Этот раствор описан в разделе В.1.2.2. Иммунопероксидазный метод для дифференциации пестивирусов с помощью МАТ.
- xv) Надосадочную жидкость отбрасывают и однократно промывают раствором 1/3 ФСБ/дистиллированная вода.
- xvi) Результаты исследования оценивают визуально. Инфицированные слои клеток имеют цитоплазму, полностью или частично окрашенную в красновато-коричневый цвет. Монослой следует изучать при слабом увеличении для определения конечной точки титрования. Цитоплазма инфицированных клеток окрашивается в темно-красный цвет. Титры нейтрализации выражаются как значение, обратное наивысшему разведению сыворотки, которое препятствует росту вируса в 50% для двух лунок-повторностей. Титр может быть рассчитан по уравнению Karber (1931)
- xvii) В исследование включают следующие контроли: клеточный контроль, положительная сыворотка и обратное титрование исследуемого вируса. Разведение вируса, внесенное в нейтрализационный планшет, проходит обратное титрование, охватывающее диапазон разведений 4 log. Обратное титрование, служащее внутренним контролем качества, должно подтвердить, что вирус использован в концентрации от 30 до 300 TCID₅₀/50 мкл. Необходимо использование эталонной сыворотки с антителами к КЧС с известным титром. Если эталонная сыворотка не дает ожидаемого результата и результат обратного титрования выходит за допустимые пределы, исследование следует повторить. За эталонной сывороткой следует наблюдать с использованием внутренней схемы отслеживания лаборатории.
- xviii) Титр при обратном титровании рассчитывается с использованием метода, описание которого имеется в литературе (Reed и Muench).

ПРИМЕЧАНИЕ: Указанное выше время инкубации приводится только для ориентировки. С целью сохранения реактивов можно использовать более длительную инкубацию с оптимизацией разведения реактивов с учетом этого времени.

2.2. Иммунофлуоресцентная реакция вируснейтрализации

2.2.1. Метод с использованием пробирок Лейтона:

- i) Суспензию клеток РК-15 высевают в концентрации 2×10^5 клеток/мл в пробирки Лейтона с покровными стеклами.
- ii) Культуры инкубируют в течение 1–2 дней при 37°C до достижения степени смыкания 70–80%.
- iii) Сыворотки инактивируют в течение 30 мин при 56°C. Для целей международной торговли рекомендуется использовать исходное разведение сыворотки 1/5 (окончательное разведение 1/10).
- iv) Разведенную сыворотку инкубируют с равным объемом суспензии вируса, содержащей 200 TCID₅₀ ВКЧС, в течение 1–2 ч при 37°C; таким образом, для каждой лунки для реакции используется постоянное количество ВКЧС 100 TCID₅₀.
- v) Вынимают покровные стекла из пробирок Лейтона, кратко промывают в среде, не содержащей сыворотки, наносят на слой клеток смесь сыворотка/вирус (с этапа iv) и инкубируют в течение 1 ч при 37°C во влажной атмосфере.
- vi) Покровные стекла помещают в чистые пробирки Лейтона и инкубируют культуры в поддерживающей среде еще в течение 2 дней.
- vii) Вынимают покровные стекла из пробирок Лейтона, промывают монослой дважды в течение 5 мин ФСБ, рН 7,2, фиксируют в чистом ацетоне в течение 10 мин и окрашивают рабочим разведением конъюгата в течение 30 мин при 37°C до промывки.

- viii) Покровные стекла монтируют на обезжиренные предметные стекла для микроскопии в 90% забуференном карбонатом/бикарбонатом глицерине, pH > 8,0, и изучают на предмет флуоресценции.

Если FAVN проводят на микротитрационных планшетах, действуют как в методике NPLA (см. раздел В.2.1.1) до этапа ix. Затем окрашивают планшеты рабочим разведением конъюгата в течение 30 мин при 37°C и изучают на предмет флуоресценции. ПРИМЕЧАНИЕ: при выявлении флуоресценции рекомендуется рассматривать планшеты сверху, с использованием длиннофокусного объектива и инвертационного микроскопа.

Сыворотки свиней, инфицированных вирусами BVD или BD, могут демонстрировать титры антител с перекрестной нейтрализацией, которые реагируют в FAVN или NPLA так, как будто эти свиньи инфицированы ВКЧС. Степень перекрестной реактивности зависит от штамма пестивируса жвачных животных и от интервала между инфицированием и временем забора проб (Wensvoort *et al.*, 1989a). В случае остающихся сомнений может быть полезным проведение сравнительных исследований с использованием штамма ВКЧС, штамма вируса BVD и штамма BD, являющихся репрезентативными для страны или региона. Сравнительные реакции нейтрализации представляют собой конечные точки титрования, в которых испытываются те же серии разведенных в два раза подозрительных образцов сывороток в двух повторностях по сравнению с 100 TCID₅₀ для каждого избранного штамма вируса. Сравнительные исследования проводятся согласно протоколам, описанным для FAVN или NPLA; использованные клеточные линии должны быть пригодными для вирусов BVD и BD. Титры нейтрализации выражаются как значения, обратные наивысшему разведению сыворотки, которое препятствует росту вируса в 50% в двух лунках-повторностях. Различия в три раза или более между конечными точками двух титрований должны считаться решающими для инфицирования вирусом, давшим наивысший титр. Для получения окончательного результата может потребоваться использование разных штаммов одного и того же генотипа и/или изучение нескольких свиней из инфицированного стада.

2.3. Твердофазный иммуноферментный анализ

Можно использовать конкурентные, блокирующие и непрямые методы с любой соответствующей поддержкой, и количество разработанных методов велико (например, Colijn *et al.*, 1997; Have, 1987; Leforban *et al.*, 1990; Moser *et al.*, 1996; Wensvoort *et al.*, 1988). Используемые методы должны минимизировать перекрестную реактивность с вирусами BVD, BD и другими пестивирусами. Однако тест-система должна обеспечивать идентификацию всех инфекций КЧС и на всех стадиях иммунного отклика на инфекцию. Большинство имеющихся в продаже тест-систем основаны на иммунодоминантном гликопротеине E2.

2.3.1. Антиген

Антиген должен происходить от или соответствовать вирусным белкам одного из рекомендованных штаммов ВКЧС. Клетки, использованные для получения антигена, должны быть свободны от любых других пестивирусов.

2.3.2. Антисыворотки

Поликлональные антисыворотки для конкурентных или блокирующих методов анализа должны быть получены от свиней или кроликов в результате инфицирования одним из рекомендованных штаммов ВКЧС или лапинизированным штаммом С. МАТ должны быть направлены против или соответствовать иммунодоминантному вирусному белку ВКЧС. Непрямые методы должны использовать противосвиной иммуноглобулиновый реактив, позволяющий выявить как IgG, так и IgM.

Чувствительность твердофазного ИФА должна быть достаточно высокой для идентификации как положительной любой сыворотки от выздоравливающих животных,

т.е. не менее чем через 21 день после заражения, реагирующей в реакции нейтрализации. твердофазный ИФА можно использовать только с образцами сыворотки или плазмы, полученными от индивидуальных свиней. Если использованный метод твердофазного ИФА не специфичен для КЧС, то образцы, давшие положительную реакцию, следует подвергнуть дальнейшему изучению с использованием методов, позволяющих дифференцировать КЧС и другие пестивирусы.

Комплексный блокирующий твердофазный ИФА (Colijn *et al.*, 1997) представляет собой одношаговый метод, пригодный для использования в автоматизированных системах твердофазного ИФА, например, роботизированных. Сыворотки изучаются в неразведенном виде. Метод быстрый и прост в проведении, позволяет выявить антитела против низковирулентных штаммов ВКЧС на ранней стадии после инфицирования. Поскольку МАТ специфичны для ВКЧС, комплексный блокирующий твердофазный ИФА редко выявляет антитела против вируса BVD, хотя антитела против вируса ВД представляют большую проблему. Сыворотки с положительной реакцией исследуются повторно для подтверждения с использованием NPLA или FAVN.

Использование маркерных вакцин зависит от дискриминатных методов, позволяющих различить вакцинированных и естественным образом инфицированных животных. В комбинации с вакциной на основе субъединицы E2 твердофазный ИФА, способный обнаружить антитела, направленные против белка E^{ms}, может быть использован в качестве дискриминатного метода. Однако имеющиеся в продаже наборы для E^{ms}-специфичного твердофазного ИФА менее чувствительны и специфичны, чем традиционные антитела к E2 КЧС для твердофазного ИФА. Рекомендуется использовать дискриминатные методы для стад, а не для диагностического анализа образцов от отдельных животных (European Commission, 2003; Floegel-Niesmann, 2001; Schroeder *et al.*, 2012).

Более подробную информацию по коммерческим наборам для диагностики можно получить в референтных лабораториях МЭБ. Даже хотя тест-наборы могут быть тщательным образом валидированы до лицензирования, каждая лаборатория должна проводить контроль серии с избранными (положительными и отрицательными) эталонными сыворотками перед использованием.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

КЧС имеет тяжелые клинические и социальноэкономические последствия для свиноводства во всем мире. Борьба с данным заболеванием обычно ведется на национальном уровне, и во многих странах проводится вакцинация как часть национальной программы по борьбе с заболеванием под эгидой регуляторного ветеринарного органа.

Указания по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Указания, приведенные здесь и в главе 1.1.8, являются общими и могут дополняться национальными и региональными требованиями. В отдельных странах или регионах к изготовителям ветеринарных вакцин для получения регистрационного удостоверения предъявляются различные дополнительные требования в отношении качества, безопасности и эффективности.

При работе с ВКЧС должны использоваться соответствующие процедуры и практики в отношении биобезопасности. Предприятие по изготовлению вакцины против КЧС должно соответствовать требованиям в отношении биобезопасности, приведенным в главе 1.1.4. *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*.

Наиболее широкое использование имеют аттенуированные живые вакцины (АЖВ), основанные на ряде аттенуированных штаммов вируса (например, штаммах С, Thiverval, PAV-250, GPE, К), и многие из них продемонстрировали безопасность и эффективность. Кроме того, существуют вакцины на основе субъединицы E2, полученные на бакуловирусных системах. Инактивированные цельновирионные вакцины в настоящее время не выпускаются.

Информацию об этих вакцинах можно найти в обзорных публикациях (Blome *et al.*, 2006; Ganges *et al.*, 2008; Geiser-Wilke, Moennig, 2004; Uttenthal *et al.*, 2010; Van Oirschot, 2003; Vannier *et al.*, 2007).

Разрабатываются новые поколения маркерных вакцин, и одна из них находится в процессе регистрации (Reimann *et al.*, 2004).

Существуют различные стратегии дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (DIVA) с помощью серологических методов (например, твердофазный ИФА) или изучения генома (например, ПЦР ОТ). Заключение, опубликованное Европейским агентством по безопасности продуктов питания (EFSA, 2008), показало, что комбинация вакцины, в которой использован штамм С, с ПЦР ОТ для выявления генома вируса у забитых животных может успешно использоваться в стратегии вакцинации «vaccination-to-live» (Li *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008).

Вакцины против КЧС используются в различных эпидемиологических условиях и ситуациях. Большинство стран, в которых данное заболевание не регистрируется, приняли стратегию контроля без профилактической вакцинации, но утвердили нормативные документы по сценарию экстренной вакцинации. В эндемичных районах вакцинация используется главным образом для снижения воздействия заболевания или в качестве первого этапа в программе эрадикации. В случае эпизоотий в регионах, где заболевание не регистрировалось ранее, экстренная вакцинация может быть дополнительным средством контроля и эрадикации заболевания.

Кроме того, можно использовать оральную вакцинацию пораженных популяций диких кабанов. Эти различные сценарии и различные системы свиноводства могут требовать разных характеристик вакцин или могут влиять на акцент в требованиях к вакцинам.

Имеются небольшие банки антигенов и вакцин, которые могут использоваться в неотложных ситуациях.

Оптимальная вакцина против КЧС должна иметь следующие общие характеристики: кратко- и долгосрочная безопасность для целевых и нецелевых видов животных (особенно для оральных вакцин), стабильность, быстрая индукция стабильного, предпочтительно долгосрочного иммунитета, эффективность в отношении всех штаммов и типов полевых вирусов, полная клиническая защита и защита от состояния носительства, профилактика горизонтальной и вертикальной передачи инфекции. Кроме того, для маркерных вакцин должны существовать надежные тесты для различения инфицированных и вакцинированных животных.

2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным живым вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

Вакцины против КЧС, полученные на живых животных, не соответствуют принципам МЭБ по защите животных. Их производство и использование следует прекратить.

2.1.1. Биологические характеристики главного посевного вируса

АЖВ получают с использованием штаммов ВКЧС, аттенуированных с помощью пассажей на культурах клеток или на соответствующих видах животных-хозяев, не принадлежащих к семейству *Suidae*. В производстве используют культуры клеток, и оно основано на системе посевных серий.

Исходный вакцинный вирус (ИВВ) для АЖВ следует выбирать и получать на основе простоты выращивания в культуре клеток, продуктивности и стабильности вируса.

Необходимо указывать точный источник исходного изолята ВКЧС, его последовательность нуклеотидов и историю пассажей.

2.1.2. Критерии качества

В качестве вакцинного вируса (рабочего вакцинного вируса и вакцинных серий) следует использовать только ИВВ, для которого установлены стерильность, чистота (отсутствие

посторонних организмов, описанных в главе 1.1.9. *Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации*, а также перечисленных соответствующими регистрационными органами) и иммуногенность. Для живых вакцин необходимо продемонстрировать, что вирус не вызывает заболевания и других нежелательных эффектов у целевых видов животных, которым ввели вакцину, в соответствии с главой 1.1.8 (раздел по *Испытаниям на безопасность* [для живого аттенуированного ИВВ]).

Подлинность ИВВ должна быть подтверждена с использованием соответствующих методов (например, с использованием специфических МАТ или методов выявления генома, специфичного для вакцинного штамма).

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Необходимо продемонстрировать удовлетворительные качества вакцины, полученной из ИВВ, в отношении безопасности и эффективности.

Хотя данные о восприимчивости свиней к возбудителю губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (TSE) отсутствуют, следует принять меры к минимизации риска его передачи путем обеспечения неиспользования материалов, несущих риск TSE, в качестве источника вируса или сред, используемых для размножения вируса.

Вакцинный вирус в конечном продукте не должен отличаться от исходного вакцинного вируса более чем на пять пассажей. Коммерческая вакцина должна выпускаться в виде серий в лиофилизированном виде как гомогенизированный продукт.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Описание процедуры производства

Вирус используется для инфицирования установленной клеточной линии. Для таких линий клеток должно быть продемонстрировано отсутствие контаминирующих микроорганизмов, и они должны соответствовать требованиям, представленным в главе 1.1.8.

Независимо от способа изготовления субстрат следует забирать в асептических условиях, и для него можно использовать соответствующие методы высвобождения связанного с клетками вируса (например, циклы замораживания-оттаивания). Полученный материал можно обработать путем фильтрования и другими методами. При необходимости можно добавить стабилизатор. Перед лиофилизацией вакцину гомогенизируют для обеспечения однородности серии.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Все ингредиенты, используемые для производства вакцины, должны соответствовать требованиям, изложенным в главе 1.1.8.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

Внутрипроизводственный контроль зависит от производственного протокола: он включает титрование вируса в нефасованном антигене и испытания на стерильность.

2.2.4. Испытания партии/серии готового препарата

- i) Стерильность
Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации описаны в главе 1.1.9.
- ii) Подлинность
Для подтверждения подлинности вакцинного вируса следует использовать соответствующие методы (методы обнаружения специфичных антител или специфичного генома).
- iii) Остаточная влажность

Уровень влажности в высушенном продукте следует определять как описано в главе 1.1.8.

iv) **Безопасность**

Испытание серий на безопасность следует проводить, если не продемонстрирована и не подтверждена в регистрационном досье устойчивая безопасность продукта и если не подтверждена стабильность производственного процесса в соответствии со стандартными требованиями, изложенными в главе 1.1.8.

Такое испытание серии конечного продукта проводится для выявления любых отклоняющихся местных или системных нежелательных реакций.

Для испытания серии на безопасность используют двух здоровых поросят возраста 6–10 недель, у которых отсутствуют антитела к пестивирусам. Каждому поросенку вводят десятикратную дозу вакцины посредством рекомендованного пути введения. За поросятами наблюдают ежедневно в течение не менее чем 14 дней. Вакцина считается прошедшей испытание, если у обоих поросят отсутствуют заметные признаки заболевания, и если животные не пали по причинам, связанным с вакциной.

v) **Активность партии/серии**

Титрование вируса является надежным индикатором активности вакцины, если была установлена связь между уровнем защиты, обеспечиваемой вакциной у свиней, и титром аттенуированной живой вакцины *in vitro*.

В отсутствие продемонстрированной корреляции между титром вируса и защитой необходимо испытание на эффективность (см. раздел С.2.3.3).

2.3. Требования к регистрации/лицензированию

2.3.1. Производственный процесс

Для регистрации вакцины вся значимая информация относительно получения ИВВ, изготовления вакцины и испытаний контроля качества (см. разделы С.2.1 и С.2.2) должна быть представлена в регуляторные органы. Эта информация должна быть представлена на основе трех выпущенных одна за другой серий, происходящих от одного и того же ИВВ, в объеме не менее 1/3 обычного объема промышленной серии.

Внутрипроизводственный контроль является частью производственного процесса.

2.3.2. Требования к безопасности

Для регистрации регуляторными органами вакцина должна пройти следующие испытания на безопасность с удовлетворительным результатом.

Вакцины должны испытываться на наличие любых патогенных эффектов у здоровых поросят и свиноматок для оценки безопасности для супоросных свиноматок и их потомства.

i) **Безопасность у молодых животных**

Испытание проводят для каждого рекомендованного пути введения с использованием в каждом случае поросят, имеющих возраст не более, чем минимальный возраст, рекомендованный для вакцинации. Используют вакцинный вирус в наименее аттенуированном уровне пассажа, присутствующем в серии вакцины.

Используют не менее восьми поросят возраста 6–8 недель, у которых отсутствуют антитела к пестивирусам. Каждому поросенку вводят количество вакцинного вируса, эквивалентное не менее чем десяти максимальным титрам вируса, которые могут содержаться в 1 дозе вакцины. За поросятами ежедневно наблюдают в течение не менее чем 14 дней. Температуру тела каждого вакцинированного поросенка измеряют в течение не менее чем 3 дней перед введением вакцины, во время введения, через 4 ч после него и затем ежедневно в течение не менее чем 14 дней. Вакцина считается прошедшей испытание, если среднее повышение температуры тела для всех поросят не превысило 1,50°C, ни у одного из поросят не

было повышения температуры более чем на 1,50°C в течение более чем 3 дней подряд, и ни у одного из поросят не наблюдалось заметных признаков заболевания и не было падежа животных в связи с введением вакцины.

Через 7 дней после вакцинации берут кровь на анализ и исследуют на предмет лейкопении. Среднее количество лейкоцитов (WBC) должно быть более 7×10^6 клеток/мл.

Кроме того, вакцины в коммерческой форме выпуска должны испытываться на безопасность в полевых условиях (см. главу 1.1.8, раздел по *Полевым испытаниям [безопасность и эффективность]*).

- ii) Испытание на безопасность у супоросных свиноматок и испытание на трансплацентарную передачу

Испытание проводят путем вакцинации с использованием рекомендованного пути введения у не менее чем восьми здоровых свиноматок или подсвинков того же возраста и происхождения, на стадии 55–70 дней гестации, у которых нет антител к пестивирусам. Используют вакцинный вирус наименее аттенуированного уровня пассажа, присутствующего в серии вакцины.

Каждой свиноматке вводят количество вакцинного вируса, эквивалентное не менее чем максимальному титру вируса, содержащемуся в 1 дозе вакцины. Клиническое наблюдение за животными проводят ежедневно до опороса. Образцы крови следует забирать у новорожденных поросят до потребления молозива.

Испытание считается недействительным, если у вакцинированных свиноматок не наблюдается сероконверсии до опороса. Вакцинный вирус считается прошедшим испытание, если не наблюдается отклонений в отношении гестации или здоровья поросят. Не должно быть свиноматок или подсвинков с заметными признаками заболевания или павших по причинам, связанным с вакциной.

В пробах крови новорожденных поросят должны отсутствовать вакцинный вирус и антитела к ВКЧС.

- iii) Отсутствие передачи вируса

Для испытания совместно содержат не менее чем 12 здоровых поросят возраста 6–10 недель, имеющих одинаковое происхождение, у которых нет антител к пестивирусам. Используют вакцинный вирус в наименее аттенуированном уровне пассажа, присутствующем в исходном вакцинном вирусе и серии вакцины. Посредством рекомендованного пути введения не менее чем шести поросьятам вводят количество вакцинного вируса не менее максимального титра вируса, содержащегося в 1 дозе вакцины.

Не менее шести поросят должны служить контролем. Совместное содержание вакцинированных и контактирующих с ними поросят начинают через 24 ч после вакцинации.

Через 45 дней гуманно умерщвляют всех поросят. Проводят соответствующие исследования поросят для выявления антител против ВКЧС и у контрольных поросят для выявления ВКЧС в миндалинах. Вакцина считается прошедшей испытание, если антитела обнаруживаются у всех вакцинированных поросят, а у контрольных поросят не обнаруживается ни антител, ни вируса.

- iv) Возврат к вирулентности

Испытание на повышение вирулентности заключается во введении вакцинного вируса в виде исходной посевной серии или после 1–2 пассажей поросьятам, у которых нет антител к пестивирусам.

Этот протокол повторяют пять раз. Каждому из двух здоровых поросят, не имеющих антител к пестивирусам, в возрасте 6–10 недель посредством рекомендованного пути введения вводят количество вакцинного вируса, эквивалентное не менее чем максимальному титру вируса, содержащемуся в 1 дозе вакцины. У каждого поросенка ежедневно забирают соответствующее количество крови в дни 2–7 после введения вакцинного вируса и объединяют образцы,

забранные в один и тот же день. Затем умерщвляют поросят и забирают миндалины у обоих, объединяют образцы миндалин и готовят 10% суспензию в ФСБ, рН 7,2, и хранят при 4°C или при -70°C для более длительного хранения. Одновременно подтверждают наличие антигенов КЧС при каждом пассаже. Кровь и объединенные образцы миндалин используют для инокуляции двух других поросят того же возраста и происхождения посредством того же пути, что и ранее. Каждому из двух других поросят того же возраста и происхождения вводят 2 мл объединенного материала (кровь и ткань миндалин) с наивысшим титром вируса посредством рекомендованного пути введения. Если вирус не обнаруживается, еще раз повторяют введение того же материала двум новым пороссятам. Если вирус опять не обнаружен, на этом процесс завершают. Однако если вирус обнаружен, проводят вторую серию пассажей путем введения 2 мл положительного материала посредством рекомендованного пути введения каждому из двух других поросят того же возраста и происхождения.

Эти пассажи проводят не менее четырех раз (в общей сложности с начала испытания должно быть вакцинировано пять групп), проверяя наличие вируса при каждом пассаже в крови и миндалинах. Следует соблюдать осторожность для избегания контаминации вирусом из предыдущих пассажей.

Вакцинный вирус считается прошедшим испытание, если не отмечено указаний на повышение вирулентности (мониторинг путем клинического наблюдения) у вируса в максимальном пассаже по сравнению с вирусом до пассажей.

Если вирус не обнаружен ни на одном из уровней пассажа в первой и второй сериях пассажей, вакцинный вирус также считается прошедшим испытание.

2.3.3. Требования к эффективности

i) Защитная доза

Эффективность вакцины оценивается у вакцинированных животных непосредственно путем оценки их устойчивости к заражению живым вирусом и выражается как количество 50% защитных доз (PD₅₀) для свиней, содержащихся в вакцинной дозе.

Испытание заключается в эксперименте по вакцинации/заражению поросят возраста 6–10 недель с использованием разных разведений испытываемой вакцины, по пять поросят на разведение. Еще одна группа из двух поросят того же возраста и происхождения используется как контроль. Все животные не должны иметь антител к пестивирусам до испытания. Каждую группу поросят, за исключением контрольной группы, вакцинируют соответствующим разведением восстановленной вакцины (например, 1/40 и 1/160 с использованием соответствующего буферного раствора).

Через 14 дней после однократного введения вакцины поросят заражают путем соответствующего введения дозы вирулентного штамма ВКЧС, убивающей не менее 50% невакцинированных поросят менее чем за 21 день. За пороссятами наблюдают в течение 21 дня и отмечают температуру тела за 3 дня до заражения и ежедневно после заражения в течение 21 дня. Количество PD₅₀ в вакцине рассчитывают на основе животных, у которых обеспечивалась защита в каждой группе, с использованием метода Спирмена-Кербера.

Испытание считается недействительным, если менее чем у 50% контрольных поросят наблюдались типичные признаки серьезной инфекции ВКЧС и они пали, и если у менее 100% контрольных поросят развились клинические признаки заболевания в течение 21 дня после заражения.

Вакцина считается прошедшей испытание, если минимальная доза соответствует не менее чем 100 PD₅₀.

ii) Защита от трансплацентарной инфекции

Используют восемь свиноматок, у которых отсутствуют антитела к пестивирусам, случайным образом разделенных на вакцинируемую группу ($n = 6$) и контрольную группу ($n = 2$).

В дни гестации 34–49 всех свиноматок из вакцинируемой группы однократно вакцинируют 1 дозой вакцины, содержащей не более минимального титра, указанного на этикетке. Через 3 недели после вакцинации всех 6 свиноматок заражают соответствующим образом дозой вирулентного штамма ВКЧС, достаточной для падежа не менее 50% невакцинированных поросят за менее чем 21 день.

Непосредственно перед опоросом свиноматок гуманно умерщвляют и исследуют плоды на предмет наличия ВКЧС. Образцы сыворотки свиноматок и плодов изучают на предмет наличия антител против ВКЧС. Проводят выделение ВКЧС из крови свиноматок (забранной через 7 и 9 дней после заражения и при умерщвлении) и гомогенизированного материала органов (миндалин, селезенки, почек, лимфатических узлов) плодов.

Испытание действительно, если вирус обнаруживается не менее чем у 50% плодов у контрольных свиноматок (за исключением мумифицированных плодов).

Вакцина считается прошедшей испытание, если вирус не обнаруживается в крови вакцинированных свиноматок и плодов вакцинированных свиноматок, и в сыворотке крови плодов вакцинированных свиноматок антитела к ВКЧС отсутствуют.

Кроме того, когда это целесообразно, вакцины следует испытать на эффективность в полевых условиях (см. главу 1.1.8, раздел по *Полевым испытаниям [безопасность и эффективность]*).

2.3.4. Продолжительность иммунитета

Как часть процедуры регистрации, изготовитель должен продемонстрировать продолжительность иммунитета данной вакцины, или с использованием заражения, или с использованием альтернативного валидированного теста, в конце заявленного периода защиты.

Не менее чем десяти вакцинированным свиньям вводят каждой количество вируса, соответствующее 10^5 PID₅₀ (медианная инфекционная доза для свиней) вирулентного штамма ВКЧС и наблюдают в течение 3 недель. Вакцинированные животные должны оставаться здоровыми, только контрольные животные должны пасть.

Продолжительность иммунитета после вакцинации против КЧС должна составлять не менее 6 месяцев.

2.3.5. Стабильность

Стабильность всех вакцин должна быть продемонстрирована как часть исследований по определению срока годности для регистрации.

Срок годности лиофилизированной вакцины против КЧС должен составлять не менее 1 года.

3. Требования к другим вакцинам

3.1. Оральная вакцина

3.1.1. Вводная информация

Наиболее широко используемая концепция оральной вакцинации диких кабанов против КЧС с помощью приманки, включая структуру приманки и схему иммунизации, была разработана, оценена и оптимизирована Kaden *et al.* (2010). Соответствующие вакцины представляют собой традиционные АЖВ. Иммунизация происходит путем поглощения оральной вакцины лимфоидной тканью слизистой оболочки ротовой полости и миндалин, где экспрессия вируса стимулирует иммунную систему (Kaden *et al.*, 2000; 2002; 2003; 2004; Kaden, Lange, 2004; Rossi *et al.*, 2010).

Безопасность является важнейшим моментом при использовании оральных вакцин, не только для целевого вида животных, но и для окружающей среды (см. главу 1.1.8) и других видов животных, которые могут контактировать с вакциной.

3.1.2. Краткое описание производства и минимальные требования к вакцинам

В дополнение к краткому описанию производства, представленному выше для инъекционных вакцин, должны выполняться следующие особые требования:

i) Способ изготовления

a) Испытания партии готового препарата

После соединения всех ингредиентов окончательная смесь имеет отличающийся состав и обычно используется в жидкой форме. Последним этапом производства серии является расфасовка окончательной смеси в блистеры/капсулы, которые вводят в приманку, или непосредственное введение в приманку. Испытания этой готовой партии проводят как описано для инъекционных вакцин, за следующими исключениями:

- Испытание на остаточную влажность

Испытание на остаточную влажность не проводится, если оральная вакцина выпускается в жидкой форме.

- Безопасность

Каждому поросенку вводят орально с помощью шприца объем, соответствующий десяти оральным дозам, как указано производителем.

ii) Требования к регистрации

В дополнение к требованиям, описанным для инъекционных вакцин, должны выполняться следующие особые требования.

a) Приманка

Приманка является составной частью продукта и должна идеально соответствовать следующим критериям:

- быть разработанной и привлекательной для целевого вида животных и адаптированной для способа распространения;
- сохранять состояние и форму в широком диапазоне температур и погодных условий;
- ингредиенты не должны причинять вред животным, соответствовать стандартам питания животных и не влиять на активность вакцины;
- нести указания и предостережения для людей с указанием типа продукта.

b) Требования к безопасности

Во всех испытаниях жидкую вакцину вводят перорально с помощью шприца (не в виде готовой приманки) для обеспечения получения каждым животным полной дозы.

- Предупреждение об опасности

Распространение оральных вакцин в окружающей среде должно соответствовать требованиям, представленным в главе 1.1.8.

c) Требования к эффективности

Эффективность должна быть продемонстрирована с использованием жидкой вакцины, вводимой шприцем для обеспечения получения каждым животным полной дозы. Для конечного продукта должны быть представлены результаты экспериментальных исследований (вакцины в составе приманки).

3.2. Вакцины, основанные на использовании биотехнологических методов

3.2.1. Вводная информация

Как сказано в разделе Е указания 3.3. *Вакцины на основе субъединицы*, традиционные живые аттенуированные вакцины против КЧС приводят к быстрому формированию иммунитета и эффективны в отношении профилактики передачи инфекции (Van Oirschot, 2003), но имеют тот недостаток, что с использованием серологических методов (например, твердофазного ИФА) невозможно отличить инфицированных свиней от вакцинированных. Коммерческие вакцины на основе субъединицы E2 (маркерные вакцины) обеспечивают более медленное формирование иммунитета и, возможно, снижение, а не полное предотвращение, размножения вируса и трансплацентарного инфицирования. Однако эти вакцины используют стратегию DIVA и в результате способствуют выполнению стратегии «vaccination to live».

Такая вакцина приводит к образованию антител только против гликопротеина E2, поэтому антитела против других антигенов ВКЧС, таких как антиген E^{RNS}, могут использоваться как маркеры инфицирования.

3.2.2. Краткое описание производства

i) Характеристики посевного вируса

Маркерную вакцину против субъединицы E2 получают с использованием представителя *Vaculovirus*, экспрессирующего антиген E2 ВКЧС. Таким образом, эта вакцина не содержит ВКЧС, а бакуловирус (вектор) химически инактивирован.

a) Биологические характеристики главного посевного вируса

В производстве используют культуры клеток насекомых, оно основано на системе посевных серий.

Выбор ИВВ в идеале должен быть основан на простоте выращивания вируса в культуре клеток, продуктивности вируса и стабильности.

Должны быть указаны точный источник изолята, включая его последовательность нуклеотидов, и история пассажей.

b) Критерии качества

Для получения вакцинного вируса следует использовать только ИВВ, для которого установлены стерильность и чистота (отсутствие посторонних организмов, описанных в главе 1.1.9, а также перечисленных соответствующими регистрационными органами) и иммуногенность.

Подлинность ИВВ должна быть подтверждена с использованием соответствующих методов (методов выявления специфических антител или специфического генома).

c) Валидация в качестве вакцинного штамма

Необходимо продемонстрировать удовлетворительные качества вакцины, полученной из ИВВ, в отношении безопасности и эффективности у свиней, для которых она предназначена.

В соответствии с главой 1.1.8, следует принять меры к минимизации риска передачи возбудителя TSE путем обеспечения неиспользования материалов, несущих риск TSE, в качестве источника вируса или сред, используемых для размножения вируса.

Вакцинный вирус, используемый для получения конечного продукта, не должен отличаться более чем на пять пассажей от материала, использованного для валидации посевной серии. Для коммерческой вакцины должна быть проведена инактивация остаточного бакуловируса и добавлен адъювант.

ii) Способ изготовления

a) Описание процедуры производства

Бакуловирус используется для инфицирования установленной клеточной линии. Для таких линий клеток должно быть продемонстрировано отсутствие контаминирующих микроорганизмов, и они должны соответствовать требованиям, представленным в главе 1.1.8.

Независимо от способа изготовления субстрат следует забирать в асептических условиях, и для него можно использовать соответствующие методы для высвобождения связанного с клетками вируса. Полученный материал можно обработать путем фильтрования и другими методами. Инактивация остаточного бакуловируса проводится предпочтительно с использованием инактиванта первого порядка. Перед смешиванием с адьювантом антиген гомогенизируют.

b) Требования к ингредиентам

Все ингредиенты, используемые для производства вакцины, должны соответствовать требованиям, изложенным в главе 1.1.8.

c) Внутрипроизводственный контроль

Проводится мониторинг инфекционности, стерильности и массы антигена. После инактивации для каждой серии антигена проводится испытание на безвредность. Клетки, используемые для испытания на отсутствие остаточного живого бакуловируса, представляют собой ту же линию клеток, что используется в производстве, потенциально в равной мере или более чувствительные клетки.

d) Испытания партии/серии готового препарата

- Стерильность

Должна соответствовать главе 1.1.8.

- Подлинность

Испытание на подлинность проводится с использованием специфической реакции вирусной нейтрализации на основе МАТ против ВКЧС или с использованием соответствующего молекулярного метода идентификации. Сыворотки, приготовленные для использования в испытании на подлинность, не должны быть приготовлены с использованием гомологичного вакцинного вируса или бакуловируса, экспрессирующего антиген субъединицы, но с использованием другого источника. Это испытание можно объединить с испытанием на активность (см. ниже).

- Безопасность и доказательство концепции маркерной вакцины

Испытание серии на безопасность должно проводиться, если не продемонстрирована и не подтверждена в регистрационном досье стабильная безопасность продукта и если для производственного процесса не подтверждено постоянство в соответствии со стандартными требованиями, приведенными в главе 1.1.8.

Это испытание серии конечного продукта на безопасность проводится для выявления любых отклоняющихся местных или системных нежелательных реакций.

В испытании на безопасность серии используют двух здоровых поросят возраста 6–10 недель, у которых отсутствуют антитела против пестивирусов. Каждому поросенку вводят посредством рекомендованного пути введения двойную дозу готовой вакцины. За поросятами ежедневно наблюдают в течение не менее чем 14 дней на предмет местных и системных реакций на вакцинацию. Через 14 дней каждому поросенку вводят вторую, разовую дозу вакцины.

Любые нежелательные реакции, связанные с вакциной, должны быть оценены, и они могут препятствовать приемке серии. Вакцина должна приводить к образованию антител против E2 ВКЧС, но не против антигена E^{RNS} ВКЧС.

- Активность партии/серии

Образование специфических анти-E2 антител у вакцинированных свиней можно использовать для подтверждения активности каждой серии, если установлена корреляция титра и результатов испытания на эффективность.

iii) Требования к регистрации/лицензированию

a) Производственный процесс

См. раздел С.2.3.1.

b) Подлинность

Испытание на подлинность проводится с помощью нейтрализации вируса с использованием иммунных сывороток против ВКЧС. Сыворотки, приготовленные для использования в испытании на подлинность, не должны быть приготовлены с использованием вакцины на основе гомологичного вируса или бакуловируса, экспрессирующего антиген субъединицы, но с использованием другого источника.

c) Требования к безопасности

• Безопасность у молодых животных

Для целей получения регистрационного удостоверения пробная серия вакцины должна быть испытана на местную и системную токсичность при рекомендованном пути введения у восьми поросят возраста 6–8 недель. Должны быть проведены испытания с однократным и многократным введением с использованием вакцин, содержащих максимально допустимую полезную нагрузку. Испытание с повторным введением должно соответствовать первичной схеме вакцинации (например, две инъекции) плюс первая ревакцинация (т.е. в общей сложности три инъекции). За животными наблюдают на предмет местных и системных реакций на вакцинацию в течение не менее чем 14 дней после каждой инъекции. Любая нежелательная реакция, связанная с вакциной, должна быть оценена и может препятствовать приемке вакцины. Должно быть продемонстрировано, что вакцина не вызывает образования антител против антигена E^{RNS} ВКЧС.

• Безопасность у супоросных свиноматок

С целью получения регистрационного удостоверения пробная серия вакцины должна быть испытана на местную и системную токсичность для каждого рекомендованного пути введения в соответствии со схемой первичной вакцинации (например, две инъекции) у восьми супоросных свиноматок. За свиноматками наблюдают на предмет местных и системных реакций на вакцинацию. Период наблюдения должен длиться до опороса с целью изучения неблагоприятных эффектов в течение гестационного периода и в отношении потомства. Любые нежелательные реакции, связанные с вакциной, следует оценить, и они могут препятствовать приемке вакцины. Должно быть доказано, что вакцина не вызывает образования антител против антигена E^{RNS} ВКЧС.

d) Требования к эффективности

• Защитная доза

Эффективность вакцины оценивается у животных, вакцинированных в соответствии с рекомендациями изготовителя, с использованием методов, описанных в разделе С.2.3.3.

• Защита от трансплацентарного инфицирования

Пробная серия вакцины должна проходить испытание, описанное в разделе С.2.3.3.

- e) Продолжительность иммунитета
Как часть процедуры регистрации изготовитель должен продемонстрировать продолжительность иммунитета (см. раздел С.2.3.4).
- f) Стабильность
Стабильность всех вакцин должна быть продемонстрирована как часть регистрационных исследований по определению срока годности. Срок годности вакцины против КЧС, полученной с помощью биотехнологических методов, должен составлять не менее 1 года (см. раздел С.2.3.5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BECHER P., AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., CEDILLO-ROSALES S., KÖNIG M., SCHWEIZER M., STALDER H., SCHIRRMAYER H. & THIEL H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, **311**, 96–104.
- BLOME S., MEINDL-BOHMER A., LOEFFEN W., THUER B. & MOENNIG V. (2006). Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25**, 1025–1038.
- BOUMA A., STEGEMAN J.A., ENGEL B., DE KLUIJVER E.P., ELBERS A.R. & DE JONG M.C. (2001). Evaluation of diagnostic tests for the detection of classical swine fever in the field without a gold standard. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 383–388.
- COLIJN E.O., BLOEMRAAD M. & WENSVOORT G. (1997). An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **59**, 15–25.
- DEPNER K., GRUBER A. & LIESS B. (1994). Experimental infection of weaner pigs with a field isolate of HC/CSF virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I: Clinical, virological and serological findings. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.*, **81**, 370–373.
- DEPNER K., PATON D.J., CRUCIERE C., DE MIA G.M., MULLER A., KOENEN F., STARK R. & LIESS B. (1995). Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14**, 677–689.
- DE SMIT A.J., TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1994). Comparison of Viral Isolation Methods from Whole Blood or Blood Components for Early Diagnosis of CSF. Report of the Meeting of the National Swine Fever Laboratories. 24–25 November 1994, Brussels, Belgium. Commission of the European Communities, DGVI/5848/95, 21–22.
- EDWARDS S., MOENNIG V. & WENSVOORT G. (1991). The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.*, **29**, 101–108.
- EUROPEAN COMMISSION (2002). Commission decision of 1 February 2002 approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of classical swine fever (2002/106/EC). *Official Journal of the European Union*, L39/71.
- EUROPEAN COMMISSION (2003). Report on the evaluation of a new Classical swine fever discriminatory test: Commission Decision 2003/265/EC. In: SANCO.10809/2003. European Commission, Directorate-General for Health and Consumer Protection, Brussels, Belgium, 1–71.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2008). Annex to *The EFSA Journal*, **932**, 1–18 and **933**, 1–16, page 31.
- FLOEGEL-NIESMANN G. (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet. Microbiol.*, **83**, 121–136.

- GANGES L., NÚÑEZ J.I., SOBRINO F., BORREGO B., FERNÁNDEZ-BORGES N., FRÍAS-LEPOUREAU M.T. & RODRÍGUEZ F. (2008). Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: Cellular responses also play a role in protection. *Science Direct*, **177**, 169–177.
- GREISER-WILKE I., DEPNER K., FRITZEMEIER J., HAAS L. & MOENNIG V. (1998). Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. *J. Virol. Methods*, **75** (2), 141–150.
- GREISER-WILKE I. & MOENNIG V. (2004). Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. *Animal Health Res. Rev.*, **5** (2), 223–226.
- HAVE P. (1987). Use of enzyme-linked immunosorbent assays in diagnosis of viral diseases in domestic livestock. *Arch. Experimentelle Veterinärmedizin*, **41**, 645–649.
- HOFFMANN B., BEER M., SCHELP C., SCHIRRMEIER H. & DEPNER K. (2005). Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J. Virol. Methods*, **130**, 36–44.
- HURTADO A., GARCIA-PEREZ A.L., ADURIZ G. & JUSTE R.A. (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. *Virus Res.*, **92**, 67–73.
- KADEN V. & LANGE E. (2004). Development of maternal antibodies after oral vaccination of young female wild boar against classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **103** (1–2), 115–119.
- KADEN V., HEYNE H., KIUPEL H., LETZ W., KERN B., LEMMER U., GOSSGER K., ROTHE A., BÖHME H. & TYRPE P. (2002). Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: concluding analysis of the recent field trials in Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **115** (5–6), 179–185.
- KADEN V., LANGE E., FISCHER U. & STREBELOW G (2000). Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: valuation of the first field study in Germany. *Vet. Microbiol.*, **73** (2363), 239–252.
- KADEN V., LANGE E., KÜSTER H., MÜLLER T. & LANGE B. (2010). An update on safety studies on the attenuated “RIEMSER Schweinepestoralvakzine” for vaccination of wild boar against classical swine fever. *Vet. Microbiol.* **143** (2–4), 133–138.
- KADEN V., LANGE E., RIEBE R. & LANGE B. (2004). Classical swine fever virus Strain „C“. How long is it detectable after oral vaccination? *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51** (6), 260–262.
- KADEN V., RENNER C., ROTHE A., LANGE E., HÄNEL A. & GOSSGER K. (2003). Evaluation of the oral immunisation of wild boar against classical swine fever in Baden-Württemberg. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **116** (9–10), 362–367.
- KÄRBER G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für Exp. Pathol. u. Pharmakologie*, **162**, 480–483.
- LEFORBAN Y., EDWARDS S., IBATA G. & VANNIER P. (1990). A blocking ELISA to differentiate hog cholera virus antibodies in pig sera from those due to other pestiviruses. *Ann. Rech. Vet.*, **21**, 119–129.

- LI Y., ZHAO J.-J., LI N., SHI Z., CHENG D., ZHU Q.-H., TU C., TONG G.-Z. & QIU H.-J. (2007). A multiplex nested RT-PCR for the detection and differentiation of wild-type viruses from C-strain vaccine of classical swine fever virus. *J. Virol. Methods*, **143** (1), 16–22.
- LISS B. & PRAGER D. (1976). Detection of neutralising antibodies (NIF) test: use of new technical equipment for laboratory swine fever diagnosis. *In: CEC Seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever*. EUR 5486, 187–197.
- LIU L., XIA H., WAHLBERG N., BELAK S. & BAULE C. (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, **385** (2), 351–357.
- LOWINGS P., IBATA G., NEEDHAM J. & PATON D. (1996). Classical swine fever virus diversity and evolution. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1311–1321.
- MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P., IBATA G., SANDS J.J., BELAK S. & PATON D.J. (1998). A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (Taq Man). *J. Virol. Methods*, **72**, 125–135.
- MOENNIG V., BECHER P. & BEER M. (2013). Classical Swine Fever. *In: Vaccines and Diagnostics for Transboundary Animal Diseases*, Roth J.A., Richt J.A. & Morozov I.A., eds. Dev. Biol. (Basel). Basel, Karger, Switzerland, Volume 135, pp 167–174.
- MOSER C., RUGGLI N., TRATSCHIN J.D. & HOFMANN M.A. (1996). Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. *Vet. Microbiol.*, **51**, 41–53.
- OGAWA N., NAKAGAWA H., YAMAMOTO H., SAWADA M., HANAKI T. & SAZAWA H. (1973). Viral detection in pigs inoculated with the GPE-strain of hog cholera attenuated virus. *Ann. Rep. Nat. Vet. Assay Lab. (Japan)*, **10**, 15–19.
- PATON D.J., MCGOLDRICK A., GREISER-WILKE I., PARCHARIYANON S., SONG J.-Y., LIOU P.P., STADEJEK T., LOWINGS J.P., BJORKLUND H. & BELAK S. (2000a). Genetic typing of classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **73**, 137–157.
- PATON D.J., MCGOLDRICK A., BENSANDE E., BELAK S., MITTELHOLZER C., KOENEN F., VANDERHALLEN H., GREISER-WILKE I., SCHEIBNER H., STADEJEK T., HOFMANN M. & THUER B. (2000b). Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.*, **77**, 71–81.
- REIMANN I., DEPNER K., TRAPP S. & BEER M. (2004). An avirulent chimeric *Pestivirus* with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Vaccine*, **322**, 143–157.
- RESSANG A.A. (1973). Studies on the pathogenesis of hog cholera. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **20**, 256–271
- RISATTI G.R., CALLAHAN J.D., NELSON W.M. & BORCA M.V. (2003). Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (1), 500–505.
- RISATTI G., HOLINKA L., LU Z., KUTISH G., CALLAHAN J.D., NELSON W.M., BREA TIO E. & BORCA M.V. (2005). Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (1), 468–471.

ROSSI S., POL F., FOROT B., MASSE-PROVIN N., RIGAUX S., BRONNER A. & LE POTIER M.F. (2010). Preventive vaccination contributes to control classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa* sp.). *Vet. Microbiol.*, **142** (1–2), 99–107. Epub 2009 Oct 3.

SCHROEDER S., VON ROSEN T., BLOME S., LOEFFEN W., HAEGEMANN A., KOENEN F. & UTTENTHAL Å. (2012). Evaluation of classical swine fever virus antibody detection assay with an emphasis on the differentiation of infected from vaccinated animals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **31** (3), 997–1010.

TERPSTRA C. (1978). Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever. *Tijdschr. Diergeneeskd*, **103**, 678–684.

TERPSTRA C., BLOEMRAAD M. & GIELKENS A.J.L. (1984). The neutralising peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **9**, 113–120.

TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1988). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 137–142.

UTTENTHAL A., PARIDA S., RASMUSSEN T.B., PATON D.J., HAAS B. & DUNDON W.G. (2010). Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (diva) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Expert. Rev. Vaccines*, **9** (1), 73–87.

VAN OIRSCHOT J.T. (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.*, **96**, 367–384.

VANNIER P., CAPUA I., LE POTIER M.F., MACKAY D.K., MUYLKENS B., PARIDA S., PATON D.J. & THIRY E. (2007). Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **26** (2), 351–372.

VANNIER P. & CARNERO R. (1985). Effets pour le porc d'un virus propagé par un vaccin contre la maladie d'Aujeszky. *Point Vet.*, **17**, 325–331.

VILCEK S., WILLOUGHBY K., NETTLETON P. & BECHER P. (2010). Complete genomic sequence of a border disease virus isolated from Pyrenean chamois. *Virus Res.*, **152** (1–2), 164–168.

WENSVOORT G., BLOEMRAAD M. & TERPSTRA C. (1988). An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **17**, 129–140.

WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1988). Bovine viral diarrhoea infections in piglets born from sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 143–148.

WENSVOORT G., TERPSTRA C., BOONSTRA J., BLOEMRAAD M. & VAN ZAANE D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.*, **12**, 101–108.

WENSVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUYVER E.P (1989a). Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.

WENSVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUYVER E.P., KRAGHTEN C. & WARNAAR J.C. (1989b). Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet. Microbiol.*, **21**, 9–20.

ZHAO J.J., CHENG D., LI N., SUN Y., SHI Z., ZHU Q.H., TU C., TONG G.Z. & QIU H.J. (2008). Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **126**, (1–3), 1–10.

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по диагностике классической чумы свиней (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики и вакцин против классической чумы свиней, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.