

ГЛАВА 2.8.6.

РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ СВИНЕЙ

РЕЗЮМЕ

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) характеризуется репродуктивными проблемами у свиноматок и респираторными заболеваниями у поросят. Возбудителем данной болезни является вирус PPCC (VPPCC), в настоящее время относимый к роду Arterivirus семейства Arteriviridae порядка Nidovirales. Основными клетками-мишенями вируса являются дифференцированные макрофаги свиней, главным образом альвеолярные, но также и присутствующие в других тканях. Существует два основных различающихся по антигенам типа вируса: тип 1 (ранее описываемый как европейский тип – ЕС) и тип 2 (ранее описываемый как североамериканский тип – СА). Раньше тип 1 был ограничен Европой, а тип 2 – Северной Америкой, но в настоящее время оба типа распространены по всему миру. Вирус передается главным образом при непосредственном контакте, но может передаваться также путем контакта с экскрементами, мочой, семенной жидкостью и инфицированными предметами. Подтверждена также возможность передачи на небольшие расстояния посредством насекомых (мух и комаров) и аэрогенным путем. PPCC встречается в большинстве свиноводческих регионов мира. Репродуктивные проблемы включают бесплодие, мумификацию плодов на поздних сроках, аборт, мертворождение и рождение ослабленных поросят, которые часто погибают после рождения от респираторных заболеваний и вторичных инфекций. У поросят более старшего возраста наблюдаются слабые признаки респираторного заболевания, обычно осложненные вторичной инфекцией. В 2006 г. высокопатогенный штамм VPPCC появился в Китае (КНР), он вызывал высокую температуру (40–42°C) во всех возрастных группах, аборт у свиноматок и высокую смертность поросят-молочников, отъемышей и поросят на откорме.

Идентификация возбудителя: *Вирусологическая диагностика инфекции VPPCC затруднена; вирус можно выделить из образцов плазмы крови или органов, таких как легкие, миндалины, лимфатические узлы и селезенка пораженных свиней. Поскольку альвеолярные макрофаги свиней являются одними из наиболее восприимчивых культуральных систем для обоих типов вируса, эти клетки рекомендуются для выделения вируса. Недавно полученные результаты показывают, что свиные моноцитарные макрофаги также могут использоваться для выделения VPPCC и его размножения в культуре. Клетки MARC-145 (клон MA-104) пригодны для выделения типа 2 VPPCC. Разные партии макрофагов различаются по восприимчивости к VPPCC. Поэтому необходимо выявить партию с высокой восприимчивостью и сохранять ее в жидком азоте для дальнейшего использования при необходимости. Идентификацию и характеристику вируса проводят с использованием окрашивания иммунной меткой с помощью специфических антисывороток или моноклональных антител. Для лабораторного подтверждения инфекции VPPCC были разработаны дополнительные методы, такие как иммуногистохимические и гибридизация *in situ* на фиксированных тканях и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.*

Серологические реакции: *В настоящее время существует широкий спектр серологических методов для выявления антител к VPPCC в сыворотке, секрете ротовой полости и мясном соке. Для выявления антител, специфических для типа 1 или типа 2 VPPCC, можно использовать иммунопероксидазный метод в монослоях и реакцию иммунной флюоресценции с использованием альвеолярных макрофагов или клеток MARC-*

145. Для диагностики ВРРСС чаще всего применяют коммерческие или внутрिलाбораторные методы твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА). Были описаны непрямой твердофазный ИФА и блокирующий твердофазный ИФА, а также двойной твердофазный ИФА, с использованием антигена обоих генотипов, типа 1 и типа 2, эти методы позволяют различать серологические реакции на эти два типа. Кроме того, имеются коммерческие твердофазные ИФА, предназначенные специально для выявления сероконверсии в отношении ВРРСС с использованием секрета ротовой полости.

Требования к вакцинам: Вакцины важны в качестве вспомогательного средства для профилактики или борьбы с репродуктивными и респираторными проблемами, обусловленными РРСС. Вакцинация аттенуированным живым вирусом может приводить к передаче вакцинного вируса с семенной жидкостью, а также вертикальной и горизонтальной передаче от свиноматки поросятам и от вакцинированных к невакцинированным свиньям. Сообщалось о последующих вызванных вакцинным вирусом нежелательных реакциях. Аттенуированный живой вирус может сохраняться в вакцинированных стадах. Существуют также цельновирионные инактивированные вакцины.

А. ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) характеризуется репродуктивными проблемами у свиноматок и респираторными заболеваниями у поросят (см. обзор Zimmerman *et al.*, 2012). РРСС впервые был описан в 1987 г. в США, в 1989 г. – в Японии и в 1990 г. – в Германии. За несколько лет он приобрел характер панзоотии. Возбудителем данного заболевания является вирус РРСС (ВРРСС). Он был обнаружен в 1991 г. в Нидерландах и в 1992 г. – в США (Zimmerman *et al.*, 2012), его относят к роду *Arterivirus* семейства *Arteriviridae* порядка *Nidovirales* (Faaberg *et al.*, 2012). ВРРСС содержит одноцепочечную положительно-полярную РНК, и его биология хорошо изучена. У других животных, кроме домашних свиней, диких свиней и диких кабанов, естественная инфекция ВРРСС не выявлена. Данный вирус не несет зоонозного риска и не заражает человека или клетки человеческого происхождения. Вскоре после обнаружения данного вируса выяснилось, что европейские и североамериканские изоляты представляют собой два разных генотипа, тип 1 и тип 2, различающиеся по антигенам (Zimmerman *et al.*, 2012). Дальнейшие исследования продемонстрировали региональные различия в пределах каждого континента. Эти различия в настоящее время становятся размытыми, поскольку тип 2 ВРРСС был завезен в Европу, а тип 1 был обнаружен в Северной Америке. Большинство изолятов ВРРСС из Южной Америки и многие азиатские изоляты относятся к типу 2, и считается, что эти вирусы были завезены вместе со свиньями или спермой. Наиболее высоковирулентные вирусы типа 2 в Юго-Восточной Азии (высокопатогенный ВРРСС) характеризуются аминокислотными делециями на участке NSP2 генома. Однако получены убедительные экспериментальные свидетельства того, что эти делеции не определяют вирулентность (Shi *et al.*, 2010a; Zhou *et al.*, 2010). Разнообразие штаммов этих двух генотипов возрастает, что связывают с высокой частотой ошибок, характерной для репликации ВРРСС, и рекомбинациями между штаммами (Murtaugh *et al.*, 2010). Были также описаны восточноевропейские штаммы ВРРСС типа 1 с высокой степенью полиморфизма, что дало новую информацию о появлении относительного нового патогена свиней. В пределах типа 1 предложено выделять подтипы 1, 2 и 3. Кроме того, появляется все больше данных о том, что может существовать еще один подтип (подтип 4) (Stadejek *et al.*, 2008; 2013). Влияние такого разнообразия на диагностику и вакцины слабо изучено, но все же вызывает озабоченность и должно учитываться. Было показано, что штаммы Lena подтипа 3 и Bog подтипа 2 обладают более высокой вирулентностью, чем штаммы подтипа 1 (Karniychuk *et al.*, 2010; Stadejek *et al.*, неопубликованные данные). Было доказано, что аттенуированная живая

вакцина подтипа 1 частично защищает от заражения штаммом Lena подтипа 3 (Trus *et al.*, 2014). Хотя в типе 2 ВРРСС выявлено девять разных генетических линий, общий уровень разнообразия в пределах типа 2 не превышает таковой в подтипе 1 (Shi *et al.*, 2010b; Stadejek *et al.*, 2013).

Репродуктивный синдром характеризуется абортами на поздних сроках гестации и ранним или поздним опоросом с рождением мертвых или мумифицированных плодов, мертворождением или рождением ослабленных поросят. Часто отмечается повышение количества животных с повторной половой охотой в острой фазе эпизоотии. Иногда сообщается об абортах на ранних и средних сроках гестации. Скорее всего, причиной связанных с ВРРСС репродуктивных нарушений является поражение вирусом плаценты и эндометрия (Karniychuk, Nauwunck, 2013). У хряков и непокрытых ремонтных подсвинков и свиноматок может наблюдаться временная лихорадка и анорексия. Респираторный синдром характеризуется диспноэ, лихорадкой, анорексией и вялостью. Более молодые поросята поражаются сильнее, чем животные более старшего возраста, при этом у хряков и свиноматок (непокрытых) инфекция часто протекает субклинически. Часто наблюдается возрастание частоты вторичных инфекций, и падеж может быть высоким. Хряки, инфицированные ВРРСС или вакцинированные живой аттенуированной вакциной, могут передавать ВРРСС с семенной жидкостью, и описаны изменения морфологии и функции сперматозоидов (Christopher-Hennings *et al.*, 1997). Вирус передается главным образом непосредственно при контакте с инфицированными свиньями, но может также передаваться через экскременты, мочу и семенную жидкость. Кроме того, его могут передавать насекомые (мухи и комары), возможна также непрямая передача с аэрозолям, приводящая к хроническим повторным инфекциям в стадах в районах с интенсивным свиноводством, а также посредством механических векторов передачи. Макро- и микроскопические поражения при инфицировании ВРРСС хорошо изучены (Zimmerman *et al.*, 2012). В целом, поражения более тяжелые у более молодых животных по сравнению с животными старшего возраста. Доказано наличие различий по вирулентности между изолятами ВРРСС в пределах одного генотипа и между генотипами, о чем свидетельствуют полевые и экспериментальные исследования (Karniychuk *et al.*, 2010; Weesendorp *et al.*, 2013). Эта изменчивость усилилась с появлением в 2006 г. в Юго-Восточной Азии линии ВРРСС, вызывающей тяжелую лихорадку свиней, синдром, сопровождающийся высоким падежом свиней всех возрастных групп (Xiao *et al.*, 2014). Хотя после обнаружения ВРРСС проведено много исследований, до сих пор остается много пробелов в знаниях относительно связей между ВРРСС и другими заболеваниями, а также относительно иммунной реакции на ВРРСС.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований для диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней и их целевое назначение

Метод	Цель					
	Отсутстви е инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренен ия	Подтвержд ение клиническ их случаев	Надзор за распростран ением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Выделение вируса	-	++	-	+++	-	-
ПЦР ОТ	+++	+++	+++	+++	++	-

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

ИГХ	-	-	-	++	-	-
ИСГ	-	-	-	++	-	-
Выявление иммунной реакции²						
Твердофазный ИФА	+++	++	+++	++	+++	++
ИПММ	++	++	++	+	++	+++
РИФ	++	++	++	+	++	+++

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 ОТ = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИГХ = иммуногистохимический метод, ИСГ = гибридизация *in situ*, твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; ИПММ = иммунопероксидазный метод в монослоях, РИФ = реакция иммунной флюоресценции.

1. Идентификация возбудителя

Идентификация ВРРСС может проводиться путем выделения вируса, выявления нуклеиновой кислоты и обнаружения вирусных белков. После инфицирования у свиней развивается вирусемия и инфекция легких, которые могут сохраняться в течение нескольких недель у молодых свиней и нескольких дней у взрослых животных, что делает сыворотку крови и бронхоальвеолярную жидкость идеальными образцами для выявления ВРРСС.

1.1. Выделение вируса

Выделение ВРРСС может представлять трудности, поскольку не все изоляты вирусов (особенно вирусов типа 1) способны легко инфицировать клетки MARC-145 и CL-2621, клоны, полученные от клеточной линии MA-104 почек обезьян (Provost *et al.*, 2012; Zimmerman *et al.*, 2012). Недавно было показано, что моноцитарные макрофаги свиней также могут быть использованы для выделения и размножения ВРРСС в культуре клеток (Garcia-Nicolás *et al.*, 2014). Их можно дифференцировать *in vitro* от мононуклеаров периферической крови свиней (РВМС) без убоя животных, в отличие от забора ткани легких для получения препаратов альвеолярных макрофагов свиней (АМС). Кроме того, было разработано несколько генетически модифицированных клеточных линий для репликации ВРРСС, включая иммортализованную клеточную линию АМС с экспрессией CD163, иммортализованные мономиелоидные клетки свиней, линию РК-15 с экспрессией CD163 и сиалоадгезина, а также клетки почек свиней, кошек и хомяков с экспрессией CD163 (Delrue *et al.*, 2010; Provost *et al.*, 2012). Были также описаны и другие, нерекомбинантные клеточные линии, перmissive для инфекции ВРРСС (Feng *et al.*, 2013; Provost *et al.*, 2012). АМС обеспечивают репликацию большинства, если не всех, изолятов ВРРСС. Однако забор АМС представляет собой непростую задачу, поскольку в качестве источника АМС могут использоваться только совершенно здоровые поросята возраста менее 8 недель (Feng *et al.*, 2013). Разные партии АМС не всегда одинаково восприимчивы к ВРРСС, поэтому необходимо каждую партию испытывать перед использованием. АМС можно хранить в жидком азоте до использования, как описано ниже. Выделение ВРРСС с использованием АМС может проводиться в большинстве диагностических лабораторий. Этот метод должен быть чувствительным для выделения всех штаммов ВРРСС и будет подробно описан. Образцы для выделения вируса следует охладить до 4°C сразу после забора и отправить в лабораторию в течение 24 - 48 ч. Период полусуществования вируса в сыворотке при этой температуре по оценке

² Достаточно одного из указанных серологических методов.

составляет 155 ч. Однако инфекционность быстро исчезает, если рН не находится в диапазоне 6,5–7,5 (Zimmerman *et al.*, 2012). Для более длительного хранения рекомендуется замораживание при -70°C .

1.1.1. Получение альвеолярных макрофагов из легких

Легкие рекомендуется забирать от свиней, свободных от специфических патогенов или в стаде свиней, для которого доказано отсутствие инфекции ВРРСС. Наилучшие результаты получают, если возраст поросенка менее 8 недель. Макрофаги следует забирать из легких в день убоя животного. Легкие промывают три или четыре раза в общей сложности примерно 200 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Полученную промывную жидкость затем центрифугируют в течение 10 мин при 300 *g*. Полученный осадок макрофагов ресуспендируют в ФСБ и центрифугируют (промывают) еще два раза. Итоговый осадок ресуспендируют в 50 мл ФСБ и подсчитывают количество макрофагов для определения концентрации клеток. Макрофаги можно использовать свежими или хранить в жидком азоте в соответствии со стандартными процедурами в итоговой концентрации около 6×10^7 макрофагов/1,5 мл (флакон). Разные партии макрофагов нельзя смешивать.

1.1.2. Испытание партий альвеолярных макрофагов

Перед использованием партии макрофагов ее следует валидировать. Это делают путем титрования стандартного ВРРСС с известным титром с использованием новых макрофагов и путем использования иммунопероксидазного метода в монослоях (ИПММ) с известными положительной и отрицательной сыворотками на планшетах с новыми макрофагами. Клетки можно использовать, только если стандартный ВРРСС демонстрирует рост до установленного титра (TCID_{50} , или 50% инфекционная доза для культуры ткани). Альвеолярные макрофаги и сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота (СЭКРС), используемая в культуральной среде, не должны содержать пестивирусов.

1.1.3. Выделение/титрование вируса на альвеолярных макрофагах

Альвеолярные макрофаги высевают в лунки микротитрационных планшетов с плоским дном для культуры тканей. После адгезии макрофаги инфицируют образцом. Образец может представлять собой сыворотку или 10% суспензию ткани, например, миндалин, легкого, лимфатических узлов и селезенки. Обычно ВРРСС демонстрирует цитопатическое действие (ЦПД) на макрофагах через 1–2 дня культивирования, но иногда вирусы оказывают незначительное ЦПД или ЦПД наблюдается только после повторного пассажа. Через 1–2 дня или после появления ЦПД присутствие ВРРСС необходимо подтвердить путем окрашивания иммунной меткой с использованием специфической антисыворотки или моноклональных антител (МАТ).

- i) Посев макрофагов на микротитрационные планшеты
Размораживают один флакон, содержащий 6×10^7 макрофагов/1,5 мл. Клетки однократно промывают 50 мл ФСБ и центрифугируют суспензию клеток в течение 10 мин при 300 *g* (при комнатной температуре). Переносят клетки в 40 мл среды RPMI (Rose-Peake Memorial Institute) 1640 с добавлением 1% глутамина, 10% СЭКРС и 1–2% смеси антибиотиков (ростовая среда). Помещают 100 мкл суспензии клеток в каждую лунку микротитрационного планшета (одним флаконом клеток можно засеять четыре планшета при концентрации 10^5 клеток в каждой лунке планшетов).
- ii) Приготовление разведений образца (сыворотка, 10% суспензия ткани) в пустом планшете
Помещают 90 мкл ростовой среды в каждую лунку микротитрационного планшета. Добавляют 10 мкл образцов в лунки рядов А и Е (разведение 1/10 в двух повторностях). Встряхивают планшеты и переносят 10 мкл из рядов А и Е в ряды

- В и F (разведение 1/100). Встряхивают планшеты и переносят 10 мкл из рядов В и F в ряды С и G (разведение 1/1000). Встряхивают планшеты и переносят 10 мкл из рядов С и G в ряды D и H (разведение 1/10000). Встряхивают планшеты. Для выделения вируса без титрования достаточно разведений 1/10 и 1/100.
- iii) Инкубация образцов
Переносят 50 мкл разведений образца из планшетов для разведения в соответствующие лунки планшета с макрофагами (первый пассаж). Инкубируют в течение 2–5 дней и ежедневно осматривают на предмет ЦПД. В день 2 высевает макрофаги в новые микротитрационные планшеты (см. выше). Переносят 25 мкл надосадочной жидкости из планшетов первого пассажа в соответствующие лунки свежезасеянных планшетов (второй пассаж). Инкубируют в течение 2–5 дней и ежедневно осматривают на предмет ЦПД.
- iv) Интерпретация результатов
Лунки, в которых макрофаги демонстрируют ЦПД только в первом пассаже, считаются ложноположительными по причине токсичности образца. Лунки, в которых макрофаги демонстрируют ЦПД в обоих пассажах или только во втором пассаже, считаются предположительно положительными. Все лунки, в которых монослой макрофагов не демонстрирует ЦПД, должны быть подтверждены как не содержащие ВРРСС с помощью иммунного окрашивания ВРРСС-положительной антисывороткой или МАТ. Демонстрирующие ЦПД образцы должны быть идентифицированы как ВРРСС-положительные с помощью культивирования образцов ЦПД-положительного супернатанта или исходных разведений образца в течение 24 и 48 ч на макрофагах с последующим иммунным окрашиванием ВРРСС-положительной антисывороткой или МАТ.
- v) Иммунное окрашивание ВРРСС-положительной антисывороткой или МАТ
Макрофаги заражают 50 мкл надосадочной жидкости или образца ткани как описано в разделе В.2.1 и выращивают инфицированные клетки в течение 24 и 48 ч. Готовят соответствующее разведение ВРРСС-положительной сыворотки в буфере для разведения и проводят иммунное окрашивание макрофагов как описано в разделе В.2.1 или В.2.2.

1.2. Методы выявления РНК

Одним из чаще всего используемых диагностических методов является обнаружение нуклеиновой кислоты ВРРСС с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ), гнездовой ПЦР ОТ и ПЦР ОТ в формате реального времени (Kleiboecker *et al.*, 2005; Wernike *et al.*, 2012a; 2012b). Преимуществами ПЦР ОТ являются высокие специфичность и чувствительность, а также быстрота оценки текущего статуса инфекции. Однако с использованием этого метода нельзя отличить инактивированный вирус от инфекционного вируса. Методы на основе ПЦР ОТ часто используются для выявления нуклеиновой кислоты в тканях и сыворотке. Высказано предположение, что изучение секрета ротовой полости также дает надежные результаты при диагностике в полевых условиях (Kittawornrat *et al.*, 2010). Вышеупомянутые методы также полезны в случае, когда выделение вируса проблематично, например, при исследовании семенной жидкости (Christopher-Hennings *et al.*, 1997) и тканей, частично разложившихся в результате автолиза или высоких температур при транспортировке образцов для выделения вируса. Большинство внутрилабораторных методов и имеющихся в настоящее время в продаже наборов дают возможность различения изолятов типов 1 и 2 (Kleiboecker *et al.*, 2005; Wernike *et al.*, 2012a; 2012b). При использовании ПЦР ОТ большую озабоченность вызывают ложноотрицательные результаты, связанные с высоким генетическим разнообразием и несоответствием праймера и зонда. В настоящее время невозможно с использованием одного анализа ПЦР ОТ выявить все штаммы ВРРСС, особенно в пределах отличающихся высоким разнообразием восточноевропейских

подтипов типа 1. Кроме того, этот метод чувствителен к контаминации. Поэтому интерпретация результатов ПЦР ОТ должна проводиться путем тщательной оценки, и настоятельно рекомендуется постоянная валидация на основе циркулирующих в настоящее время штаммов ВРРСС (Wernike *et al.*, 2012a). Альтернативным методом, не требующим новейшего оборудования, в отличие от ПЦР ОТ в формате реального времени, является петлевая изотермическая амплификация с обратной транскрипцией (RT-LAMP) (Zimmerman *et al.*, 2012). Все эти методы изучения нуклеиновых кислот более быстрые, чем выделение вируса, и не требуют оборудования для культивирования клеток. Анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов продуктов ПЦР-амплификации был разработан и используется для дифференциации полевых и вакцинных изолятов ВРРСС (Zimmerman *et al.*, 2012), и молекулярные эпидемиологические исследования штаммов ВРРСС проводились с использованием филогенетического анализа специфических последовательностей структурных генов. Однако высокая частота рекомбинации, наблюдаемая в полевых условиях, может влиять на результаты филогенетического анализа, основанного на коротких фрагментах генома. Хотя гибридизация *in situ* редко используется для диагностических целей, она позволяет выявлять и дифференцировать типы 1 и 2 ВРРСС в фиксированных формалином тканях. На чувствительность и специфичность этих методов в отношении выявления генома ВРРСС может влиять очень высокое генетическое разнообразие ВРРСС, особенно в пределах типа 1. Для идентификации вирусных белков можно использовать иммуногистохимические методы, которые при проведении на фиксированных формалином тканях позволяют визуализировать антиген вместе с поражением тканей (Zimmerman *et al.*, 2012).

2. Серологические реакции

Для выявления антител к ВРРСС в сыворотке крови описано много методов. Серологическая диагностика в целом проста в исполнении и обладает хорошей специфичностью и чувствительностью на уровне стада. Сыворотки отдельных свиней иногда вызывают затруднения по причине неспецифических реакций, но эта проблема может быть решена путем повторного забора проб в популяции свиней через 2–3 недели. Серологические исследования обычно проводятся с анализом связывания, таким как иммунопероксидазный метод в монослоях (ИПММ), реакция иммунной флюоресценции (РИФ) или твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) – для которых описано много вариантов (Diaz *et al.*, 2012; Jusa *et al.*, 1996; Sorensen *et al.*, 1998; Venteo *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 1992). Эти исследования часто проводятся с вирусным антигеном, представляющим один генотип, что означает, что антитела, направленные против другого, гетерологического генотипа, могут выявляться с меньшей чувствительностью. Блокирующий твердофазный ИФА широко используется в Дании и описан как двойной твердофазный ИФА, разработанный с использованием в качестве антигенов вирусов типов 1 и 2 и поэтому способный дифференцировать серологические реакции на оба типа (Sorensen *et al.*, 1998). Это очень важно, поскольку штаммы типа 2 циркулируют в Европе в результате использования аттенуированных живых вакцин типа 2 и независимого завоза (Stadejek *et al.*, 2013). Сообщалось также о выявлении штаммов ВРРСС типа 1 в Северной Америке и Азии (Kleiboeker *et al.*, 2005; Zimmerman *et al.*, 2012). Частота инфекций типа 2 в Европе и типа 1 в Северной Америке и Азии изучена недостаточно. Поскольку оба типа ВРРСС распространены по всему миру, серологические методы должны включать антигены обоих типов. Существуют коммерческие твердофазные ИФА с хорошими чувствительностью и специфичностью, проведено их сравнение (Diaz *et al.*, 2012, Venteo *et al.*, 2012).

Антитела к вирусу можно обнаружить с помощью анализа связывания с антителами уже через 7–14 дней после инфекции, и уровни антител достигают максимальных титров через 30–50 дней. Некоторые свиньи могут стать серонегативными через 3–6 месяцев, но

остальные остаются серопозитивными намного дольше. Антитела против ВРРСС также обнаруживались в мышечном транссудате и секрете ротовой полости. Нейтрализующие антитела образуются медленно и не достигают высоких титров. Они могут появиться через 3 - 4 недели после инфицирования и сохраняться в течение 1 года или более, или же они не обнаруживаются. Сообщалось об использовании комплемента для повышения чувствительности реакции вируснейтрализации в сыворотке (Jusa *et al.*, 1996). Подробного изучения продолжительности сохранения титров антител после инфицирования до сих пор не проведено, и результаты, вероятно, зависят от использованного метода исследования. Период полусуществования материнских антител составляет 12 - 14 дней, и титр материнских антител в целом может быть выявлен до 4 - 8 недель после рождения, в зависимости от титра антител у свиноматки при опоросе и использованного метода. В инфицированной среде поросята, рожденные серопозитивными самками, могут иметь активную сероконверсию начиная с возраста 3 - 6 недель.

В данной главе подробно описан ИПММ, поскольку этот метод легко использовать в лабораториях, где применяются процедуры выделения вируса с использованием макрофагов, и его можно использовать с вирусами обоих антигенных типов. Этот анализ также можно легко адаптировать для клеточной линии MARC-145 для обоих генотипов (Jusa *et al.*, 1996). Непрямая реакция иммунной флюоресценции (РИФ) с использованием клеток MARC-145 также может быть проведена для серологического исследования ВРРСС, и этот метод описан в настоящей главе.

2.1. Выявление антител с помощью иммунопероксидазного метода в монослоях

Альвеолярные макрофаги высевают в лунки микротитрационных планшетов. После прикрепления макрофаги инфицируют ВРРСС. Цель состоит в инфицировании примерно 30–50% макрофагов в лунке, чтобы можно было отличить сыворотки с неспецифической реакцией. После периода инкубации макрофаги фиксируют и используют как клеточный субстрат для серологического исследования. Альтернативный метод заключается в использовании клеток MARC-145 вместо макрофагов. На каждом планшете можно исследовать 11 сывороток в двух повторностях. Исследуемые сыворотки разводят и инкубируют на клеточном субстрате. Если в исследуемой сыворотке имеются антитела, они будут связываться с антигеном в цитоплазме макрофагов. На следующем этапе инкубации связанные антитела будут выявлены с помощью антисвиного конъюгата пероксидазы хрена (HRPO). В заключение клеточный субстрат инкубируют с раствором хромоген/субстрат³. Для получения результатов планшеты изучают с использованием инверсионного микроскопа.

2.1.1. Посев макрофагов на микротитрационные планшеты

- i) Размораживают один флакон, содержащий 6×10^7 макрофагов/1,5 мл.
- ii) Клетки однократно промывают 50 мл ФСБ и центрифугируют клеточную суспензию в течение 10 мин при 300 g (комнатная температура).
- iii) Клетки помещают в 40 мл среды RPMI-1640 с добавлением 1% глутамина, 10% СЭКРС, 100 МЕ (международных единиц) пенициллина и 100 мкг стрептомицина на 1 мл (ростовая среда).

³ *Приготовление раствора хромогена*

Исходный раствор хромогена (3-амино-9-этилкарбазол [АЭК]): (а) 4 мг АЭК; (b) 1 мл N,N-диметилформамида.

Растворяют (а) в (b) и хранят исходный раствор АЭК при 4°C в защищенном от света месте.

Приготовление раствора хромоген/субстрат (готовят непосредственно перед использованием)

Готовят 0,05 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,0, следующим образом: растворяют 4,1 г ацетата натрия в 1 л дистиллированной воды. Доводят pH до 5,00 100%-ной уксусной кислотой. Добавляют 1 мл исходного раствора АЭК к 19 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера. Добавляют 10 мкл 30% H₂O₂ к каждому 20 мл раствора хромоген/субстрат. Раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 5 мкм.

- iv) Помещают 100 мкл клеточной суспензии в каждую лунку микротитрационного планшета (одним флаконом клеток можно засеять четыре планшета в концентрации 10^5 клеток в каждой лунке планшетов).
- v) Планшеты инкубируют в течение 18–24 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ во влажных условиях. Альтернативой является использование буфера HEPES (N-2-оксиэтилпиперазин, N-2-этансульфоная кислота) в качестве среды.

2.1.2. Инфицирование клеток ВРСС

- i) В каждую лунку добавляют 50 мкл суспензии вируса, содержащей 10^5 TCID₅₀/мл, но две лунки оставляют неинфицированными для использования в качестве контроля.
- ii) Планшеты инкубируют в течение 18–24 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂.

2.1.3. Фиксация клеток

- i) Отбрасывают ростовую среду и промывают планшеты один раз физиологическим раствором.
- ii) Осторожно постукивают планшетами по полотенцу для удаления избытка жидкости, затем высушивают их (без крышки) в течение 45 мин при 37°C.
- iii) Замораживают планшеты (без крышки) в течение 45 мин при -20°C. (Планшеты, которые не будут использоваться сразу же для исследования, можно закрыть и хранить при -20°C.)
- iv) Инкубируют клетки в течение 10 мин при комнатной температуре с охлажденным 4% параформальдегидом (в ФСБ). В качестве альтернативы клетки можно фиксировать в охлажденном на льду абсолютном этаноле в течение 45 мин при 5°C или в охлажденном на льду 80% ацетоне в течение 45 мин.
- v) Отбрасывают параформальдегид и промывают планшеты однократно физиологическим раствором.

2.1.4. Приготовление разведений сыворотки в планшете для разведения

- i) Помещают 180 мкл 0,5 М NaCl с 4% лошадиной сыворотки и 0,5% твина-80, рН 7,2 (буфер для разведения), в лунки рядов А и Е пустого планшета.
- ii) Помещают 120 мкл буфера для разведения во все другие лунки.
- iii) Добавляют 20 мкл исследуемой сыворотки или контрольных сывороток в лунки рядов А и Е (= разведение 1/10) и встряхивают.
- iv) Разводят сыворотки в четыре раза, перенося 40 мкл из рядов А и Е в ряды В и F, а затем таким же образом получают разведения 1/40, 1/160 и 1/640.

2.1.5. Инкубация сывороток на планшете с фиксированными макрофагами

- i) Переносят 50 мкл из каждой лунки планшета для разведения в соответствующие лунки планшета с фиксированными макрофагами. Закрывают планшет и инкубируют в течение 1 ч при 37°C.
- ii) Отбрасывают разведения сыворотки и промывают планшет три раза в 0,15 М NaCl + 0,5% твина-80.

2.1.6. Инкубация с конъюгатом

- i) Разводят кроличий-антисвиной (или антимышиный, при окрашивании планшета для выделения МАТ) конъюгат HRPO до установленного разведения в 0,15 М NaCl + 0,5% твина-80. Добавляют 50 мкл разведения конъюгата во все лунки планшета. Закрывают планшет и инкубируют в течение 1 ч при 37°C. Планшет промывают три раза.

2.1.7. Процедура окрашивания

- i) Помещают 50 мкл фильтрованного раствора хромоген/субстрат (АЭК) во все лунки планшета (см. сноску 3).
- ii) Инкубируют АЭК в течение не менее чем 30 мин при комнатной температуре.
- iii) Заменяют АЭК на 50 мкл 0,05 М ацетата натрия, рН 5,0 (см. сноску 3).

2.1.8. Интерпретация результатов

Если в исследуемой сыворотке присутствуют антитела, то цитоплазма примерно 30–50% клеток в лунке окрашивается хромогеном в ярко-красный цвет. При отсутствии в исследуемой сыворотке антител цитоплазма остается неокрашенной. При неспецифической реакции сыворотки могут окраситься все клетки в лунке (сравнимо с сывороткой положительного контроля). Титр сыворотки выражается как значение, обратное наивысшему разведению, в котором окрашивается 50% или более лунок. Сыворотка с титром < 10 считается отрицательной. Сыворотка с титром 10 или 40 считается слабоположительной. В этих разведениях часто отмечается неспецифическое окрашивание. Сыворотка с титром ≥ 160 считается положительной.

2.2. Выявление антител в непрямой реакции иммунной флуоресценции

Хотя в настоящее время не существует единственного стандартного общепринятого иммунофлуоресцентного метода, различными североамериканскими лабораториями были разработаны и используются несколько методов. РИФ можно проводить в микротитрационных планшетах или на стеклах с восемью камерами с использованием клеточной линии MARC-145 и изолята, адаптированного к клеточной линии MARC-145. Для предотвращения перекрестной реакции с пестивирусом рекомендуется, чтобы клетки и СЭКРС, добавляемая к культуральной среде, не содержали пестивирусов. После периода инкубации инфицированные ВРРСС клетки фиксируют и используют в качестве клеточного субстрата для серологических исследований. Образцы сыворотки исследуют в одном скрининговом разведении 1/20 и регистрируют отрицательную или положительную реакцию образцов при этом разведении. Каждая исследуемая свиная сыворотка добавляется в лунки или камеры, содержащие инфицированные ВРРСС клетки. Если в сыворотке присутствуют антитела к ВРРСС, то они связываются с антигенами в цитоплазме инфицированных клеток. После этого этапа добавляется антисвиной IgG, конъюгированный с флуоресцеином, который связывается со свиными антителами, которые связаны с антигеном ВРРСС в инфицированных клетках. Результаты получают с использованием флуоресцентного микроскопа. Микротитрационные планшеты можно также использовать для титрования сыворотки (см. раздел В.2.3 ниже).

2.2.1. Посев и инфицирование клеток MARC-145 в микротитрационных планшетах

- i) Добавляют 50 мкл среды для культуры клеток (например, минимальной поддерживающей среды [MEM], содержащей 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 100 МЕ пенициллина и 100 мкг стрептомицина) без СЭКРС в каждую лунку колонок 2, 4, 6, 8, 10 и 12 96-луночного планшета с использованием многоканальной пипетки.
- ii) Сомкнутые клетки MARC-145 (выращенные в колбах для культуры клеток) обрабатывают трипсином для использования для посева в 96-луночные микротитрационные планшеты и ресуспендируют клетки в среде для культуры клеток, содержащей 8% СЭКРС в концентрации 100000-125000 клеток/мл. Клетки MARC-145 из колб для культивирования для РИФ обрабатывают трипсином один раз в неделю с использованием трипсина/ЭДТА (этилендиаминотетрауксусной кислоты) и высевают в колбы для культивирования в концентрации 250000 клеток/мл. После 4 дней выращивания в колбах для культивирования в течение еще 3 дней добавляют новую среду для культуры клеток, содержащую 2% СЭКРС.

- iii) С использованием многоканальной пипетки добавляют 150 мкл суспензии клеток в каждую лунку 96-луночного планшета.
- iv) Препарат ВРРСС разводят в МЕМ без СЭКРС до концентрации $10^{2.2}$ TCID₅₀/50 мкл и вносят 50 мкл в каждую лунку колонок 1, 3, 5, 7, 9 и 11.
- v) Планшеты инкубируют в течение примерно 48 - 72 ч при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO₂ для получения монослоя с примерно 40–50% инфицированных клеток, определенных с помощью непрямой иммунной флюоресценции. В качестве альтернативы микротитрационные планшеты можно сначала засеять суспензией клеток MARC-145 (например, в концентрации 100000 клеток/мл в среде с добавлением 5–10% СЭКРС) и инкубировать в течение до 72 ч до смыкания. Затем в каждую лунку вносят 50 мкл препаратов ВРРСС (например, 10⁵ TCID₅₀/мл) и планшеты инкубируют еще в течение 48–72 ч до фиксации. Считается, что использование в среде органических буферов, таких как NEPES, стабилизирует pH, когда нет инкубаторов с CO₂.

2.2.2. Посев и инфицирование клеток MARC-145 на стеклах с восемью камерами

- i) Добавляют 500 мкл суспензии клеток MARC-145 (например, в МЕМ с добавлением 10% СЭКРС) в концентрации 100000 клеток/мл в каждую камеру стекл с восемью камерами.
- ii) Инкубируют клетки в течение примерно 48–72 ч при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO₂ до смыкания.
- iii) В каждую камеру добавляют 50 мкл суспензии ВРРСС, содержащей 10⁵ TCID₅₀/мл, снова инкубируют клетки в течение примерно 18 ч при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO₂. При этом с помощью непрямой иммунной флюоресценции можно наблюдать 15–20 инфицированных клеток в поле зрения.

2.2.3. Фиксация клеток

- i) Отбрасывают среду, однократно промывают ФСБ и отбрасывают ФСБ. В случае стекл с камерами удаляют пластиковые стенки камер, оставляя прокладки на месте.
- ii) Добавляют 150 мкл охлажденного (4°C) ацетона (80% в воде) в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшеты инкубируют при 4°C в течение 30 мин. В случае стекл с камерами для фиксации клеток используют ацетон (80–100%) при комнатной температуре в течение 10–15 мин. Некоторые производственные марки ацетона повреждают прокладки камер стекл, оставляя пленку на стекле. Рекомендуется проверить ацетон перед его использованием для фиксации.
- iii) Отбрасывают ацетон и высушивают планшеты и стекла при комнатной температуре.
- iv) Затем планшеты помещают в пластиковый пакет, закрывают и хранят при -70°C до использования. Стекла с камерами можно хранить в таких же условиях в коробках для стекл.

2.2.4. Приготовление разведений сыворотки

- i) Образцы сыворотки разводят до разведения 1/20 в ФСБ (0,01 М; pH 7,2) в отдельных 96-луночных планшетах (например, с использованием многоканальной пипетки добавляют 190 мкл ФСБ, а затем 10 мкл исследуемых сывороток).
- ii) В качестве контролей используют эталонные сыворотки, содержащие и не содержащие антитела ВРРСС, с известным титром.

2.2.5. Инкубация сывороток с фиксированными клетками MARC-145

- i) Хранившиеся планшеты вынимают из морозильной камеры с температурой -70°C, и когда планшеты достигнут комнатной температуры, восстанавливают

оводненность клеток, добавляя 150 мкл ФСБ на несколько минут. Отбрасывают ФСБ, перевернув планшеты и насухо промокнув бумажным полотенцем. Клетки на стеклах с восемью камерами не увлажняют.

- ii) Добавляют 50 мкл каждого разведения сыворотки в одну лунку, содержащую фиксированные неинфицированные клетки, и в одну лунку, содержащую фиксированные инфицированные клетки. Такой же объем каждой сыворотки вносят в одну камеру.
- iii) Добавляют 50 мкл разведений сыворотки отрицательного контроля и сыворотки положительного контроля аналогичным образом.
- iv) Планшеты инкубируют в закрытом виде при 37°C в течение 30 мин во влажной атмосфере. Стекла инкубируют сходным образом в коробках или лотках для стекол в закрытом виде.
- v) Удаляют образцы сыворотки и промокают планшеты насухо бумажным полотенцем. Производят в общей сложности шесть промывок с использованием 200 мкл ФСБ. ФСБ вносят в каждую лунку, затем переворачивают планшеты для удаления ФСБ. После удаления образцов сыворотки стекла ополаскивают ФСБ с последующей 10-минутной промывкой.

2.2.6. Инкубация с конъюгатом

- i) Добавляют 50 мкл соответствующим образом разведенного (в свежеприготовленном ФСБ) кроличьего, мышинного или козьего антисвиного IgG (тяжелая и легкая цепи), конъюгированного с ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианатом), в каждую лунку с использованием многоканальной пипетки. Такой же объем добавляют в отдельные камеры.
- ii) Планшеты или стекла инкубируют в закрытом виде при 37°C в течение 30 мин во влажной атмосфере.
- iii) Удаляют конъюгат из планшетов и насухо промокают планшеты бумажным полотенцем. Проводят в общей сложности четыре промывки ФСБ, как описано выше. Отбрасывают конъюгат со стекол, ополаскивают ФСБ, промывают в течение 10 мин в ФСБ и ополаскивают дистиллированной водой. Постукивают стеклами по абсорбирующей подушечке для удаления избытка воды.
- iv) Планшеты и стекла изучают с использованием флуоресцентного микроскопа.

2.2.7. Интерпретация результатов

Наличие зеленой флуоресценции в цитоплазме инфицированных клеток в сочетании с отсутствием этого сигнала в неинфицированных клетках указывает на наличие антител к ВРРСС в сыворотке при испытанном разведении. Степень интенсивности флуоресценции может варьировать в зависимости от количества специфичных антител к ВРРСС, присутствующих в исследуемой сыворотке.

Отсутствие специфической зеленой флуоресценции как в инфицированных, так и в неинфицированных клетках интерпретируется как отсутствие антител к ВРРСС в этой сыворотке при испытанном разведении. Исследование следует повторить, если флуоресценция не наблюдается при использовании сыворотки положительного контроля с инфицированными клетками, или флуоресценция наблюдается при использовании сыворотки отрицательного контроля с инфицированными клетками. Не должно наблюдаться флуоресценции в неинфицированных клетках ни в одной из контрольных сывороток. Исследуемые сыворотки, давшие сомнительные результаты, следует исследовать повторно в разведении 1/20, и если результаты все равно неясны, требуется новый образец сыворотки от того же животного для дальнейшего исследования.

2.3. Оценка сывороток на предмет титра антител с помощью РИФ

Микротитрационные планшеты и РИФ можно также использовать для титрования сыворотки. На микротитрационном планшете на 96 лунок можно титровать до 16 сывороток.

2.3.1. Методика

- i) На 96-луночные микротитрационные планшеты высевают клетки MARC-145 (в концентрации 10^4 клеток на лунку) или клетки АМС (примерно 10^5 клеток на лунку) и инкубируют при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO_2 до смыкания.
- ii) Засевают все лунки суспензией ВРРСС в концентрации, подобранной так, чтобы получить примерно 100 локусов инфицированных клеток на лунку (для облегчения правильной интерпретации результатов), за исключением колонок 1, 6 и 11. Планшеты инкубируют при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO_2 в течение 48–72 ч.
- iii) Отбрасывают культуральную среду и промывают монослой один раз ФСБ (0,01 М, рН 7,2). Фиксируют монослой холодным ацетоном (80% водный раствор) в течение 10 мин при температуре окружающей среды. Отбрасывают ацетон, сушат планшеты на воздухе и хранят до использования в закрытом виде при -20°C для краткосрочного хранения или -70°C для долгосрочного хранения.
- iv) Делают серийные разведения сывороток, включая сыворотку положительного контроля ВРРСС, с использованием четырехкратного разведения в ФСБ, начиная с 1/16 или 1/20. Делают разведение сыворотки отрицательного контроля 1/16 или 1/20. Помещают 50 мкл каждого разведения (1/16, 1/64, 1/256, 1/1024 или 1/20, 1/80, 1/320, 1/1280) в лунки, содержащие вирусный антиген, в колонках 2, 3, 4, 5 или 7, 8, 9, 10. Для каждой сыворотки также вносят 50 мкл разведения 1/16 или 1/20 в контрольные лунки колонок 1 и 6. Аналогичным образом вносят разведения сывороток положительного и отрицательного контроля в лунки колонок 11 и 12.
- v) Планшеты инкубируют при 37°C в течение 30 мин во влажной камере. Отбрасывают сыворотку и промывают планшеты три раза с использованием ФСБ.
- vi) Добавляют 50 мкл соответствующим образом разведенного антисвиного IgG, конъюгированного с ФИТЦ, и инкубируют планшеты при 37°C в течение 30 мин во влажной камере. Отбрасывают конъюгат, промывают планшеты несколько раз и промокают планшеты абсорбирующим материалом для удаления избытка жидкости.

2.3.2. Интерпретация результатов

После изучения с помощью флуоресцентного микроскопа отмечают титр сыворотки как значение, обратное наивысшему разведению сыворотки, при котором наблюдается типичная флуоресценция цитоплазмы. Для парных образцов сыворотки четырехкратное возрастание титра за интервал в 2 недели указывает на активную инфекцию у отдельного животного. Не должно наблюдаться специфической флуоресценции у неинфицированных контрольных клеток для исследуемой сыворотки и сывороток положительного и отрицательного контроля. Не должно наблюдаться флуоресценции у инфицированных клеток для сыворотки отрицательного контроля. Специфическая флуоресценция должна наблюдаться у инфицированных клеток для сыворотки положительного контроля в соответствующих разведениях. Конечная точка РИФ может варьировать между лабораториями. Результаты исследования также могут варьировать в зависимости от использованного изолята ВРРСС по причине антигенного разнообразия.

2.4. Выявление антител с помощью твердофазного иммуноферментного анализа

Твердофазный ИФА является одним из наиболее часто используемых методов для выявления антител, специфичных для ВРРСС, и позволяет быстро, специфично и избирательно подтвердить наличие вируса. Некоторые лаборатории разработали методы

твердофазного ИФА (непрямые или блокирующие) для серологических исследований (Diaz *et al.*, 2012; Sorensen *et al.*, 1998; Venteo *et al.*, 2012). Описан двойной блокирующий формат твердофазного ИФА, позволяющий дифференцировать серологические реакции на вирусы типа 1 и типа 2 (Sorensen *et al.*, 1998). В другом исследовании сообщили о разработке твердофазного ИФА, который позволяет дифференцировать инфекцию высокопатогенного ВРРСС типа 2 от инфекции классического ВРРСС типа 2 (Xiao *et al.*, 2014). Наборы твердофазного ИФА имеются в продаже для определения серологического статуса свиней в отношении ВРРСС, в том числе с использованием секрета ротовой полости в качестве диагностического матрикса (Kittawornrat *et al.*, 2010; Venteo *et al.*, 2012). В этих наборах в качестве антигенов использован один из двух типов по отдельности или комбинацию антигенов типа 1 и типа 2. Основным преимуществом этих методов является быстрая обработка большого количества образцов. Существуют коммерческие твердофазные ИФА, в которых в качестве антигенов использованы рекомбинантные белки обоих типов ВРРСС. Высказывалось также предположение о возможности твердофазного ИФА на основе неструктурных белков NSP1, NSP2 и NSP7. Характеристики твердофазного ИФА на основе NSP7 были сравнимыми с таковыми коммерческих наборов твердофазного ИФА. Кроме того, этот метод позволил различить специфические для типов гуморальные реакции и устранить 98% ложноположительных результатов, полученных при коммерческом анализе (Brown *et al.*, 2009).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование препарата

Аттенуированные живые (АЖВ) и инактивированные (убитые) вакцины против ВРРСС зарегистрированы и продаются во многих странах для борьбы с репродуктивными и/или респираторными формами РРСС (Murtaugh *et al.*, 2011). Считается, что вакцинация особенно полезна, когда вакцина имеет антигенную близость с полевым вирусом (Scotti *et al.*, 2006). Однако нет способов прогнозирования эффективности вакцины. Хотя вакцинация свиней не предотвращает инфицирование ВРРСС, она может быть полезна в стадах, имеющих проблемы с РРСС. Убитые вакцины зарегистрированы для использования в качестве вспомогательного средства для снижения количества абортос и ослабленных поросят, связанных с репродуктивной формой РРСС. АЖВ предназначены для использования у свиноматок и подсвинков за 3–6 недель до осеменения и у поросят возраста от 3 недель или более в качестве вспомогательного средства для снижения заболеваемости, связанной с РРСС. АЖВ не предназначены для использования в стадах, где заболевание не зарегистрировано, или у хряков репродуктивного возраста. Вакцинный вирус может сохраняться у хряков и распространяться с семенной жидкостью (Christopher-Hennings *et al.*, 1997). Вирус АЖВ может распространяться и передаваться невакцинированным контактным свиньям или вертикально потомству (Zimmerman *et al.*, 2012). Вакцины, полученные с помощью биотехнологических методов, находятся в стадии разработки, но пока отсутствуют на рынке. Указания по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Указания, приведенные здесь и в главе 1.1.8, имеют общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Для изолята ВРРСС, используемого для производства вакцины, должны быть описаны происхождение и история пассажей. Исходный вакцинный вирус (ИВВ) должен быть безопасным у свиней в предлагаемом возрасте вакцинации и обеспечивать защиту от

заражения. Для изолятов, используемых в АЖВ, должно быть продемонстрировано, что у вируса не возвращается вирулентность после пассажа у животных-хозяев.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних микроорганизмов)

ИВВ не должен быть контаминирован бактериями, грибами и микоплазмами. ИВВ должен пройти испытания на отсутствие посторонних вирусов, включая вирус инфекционного гастроэнтерита, респираторный коронавирус свиней, вирус эпидемической диареи свиней, аденовирус свиней, цирковирус свиней типов 1 и 2, вирус гемагглютинирующего энцефалита свиней, парвовирус свиней, вирус вирусной диареи крупного рогатого скота, реовирус и вирус бешенства, с использованием метода флуоресцирующих антител. ИВВ должен пройти испытания на отсутствие посторонних вирусов на основе ЦПД и гемадсорбции на клеточной линии Vero и эмбриональных свиных клеточных типах.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Описание процедуры производства

ВРРСС размножают на стабильной клеточной линии, такой как клетки MARC-145 (клон MA-104). Размножение вируса не должно включать более пяти пассажей после исходного вакцинного вируса (ИВВ), если не будет показано, что дальнейшие пассажи обеспечивают защиту у свиней.

Клеточную линию высевают в соответствующие сосуды. В качестве среды для производства вакцины используют МЕМ с добавлением СЭКРС. Культуры клеток инокулируют непосредственно рабочим вирусом РРСС, который обычно проходит 1–4 пассажа после ИВВ. Инокулированные культуры инкубируют в течение 1–8 дней до забора культуральной среды. В ходе инкубации за культурами ежедневно наблюдают на предмет ЦПД и контаминации бактериями.

В инактивированных вакцинах вирус инактивируется химически, или формалином, или бинарным этиленимином, и смешивается с соответствующим адъювантом. АЖВ обычно смешиваются со стабилизатором до розлива и лиофилизации. Если для инактивации используется формалин, необходимо провести испытание конечного продукта на концентрацию остаточного формальдегида, которая не должна превышать 0,74 г/л.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

СЭКРС не должна содержать пестивирусов и антител к пестивирусам и не нести риска губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

Производственные серии ВРРСС для АЖВ и для инактивированных (убитых) вакцин необходимо титровать в культуре ткани для стандартизации продукта. Серии с низким титром можно концентрировать или смешивать с сериями с более высоким титром для достижения надлежащего титра.

2.2.4. Испытания партии готового препарата

Образцы фасованного продукта испытываются на чистоту, безопасность и активность. Флаконы с АЖВ также испытывают на максимальное допустимое содержание воды.

i) Стерильность и чистота

Образцы изучают на предмет контаминации бактериями, грибами и пестивирусами. Для испытания на содержание бактерий в АЖВ в десять флаконов, каждый из которых содержит 120 мл среды с соевым казеиновым гидролизатом, высевают по 0,2 мл из образцов, расфасованных в конечную тару. Эти десять сосудов инкубируют при 30–35°C в течение 14 дней и наблюдают на предмет роста бактерий. Для испытания на содержание грибов в десять сосудов, каждый из

которых содержит 40 мл среды с соевым казеиновым гидролизатом, высевают по 0,2 мл из образцов, расфасованных в конечную тару. Сосуды инкубируют при 20–25°C в течение 14 дней и наблюдают на предмет роста грибов. В случае убитых вакцин требуется высевать по 1,0 мл из десяти образцов в окончательной упаковке в соответствующие десять сосудов со средой. Контаминация пестивирусами должна оцениваться в соответствии с указаниями, приведенными в главе 1.1.9. *Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации* и главе 2.8.3. *Классическая чума свиней*.

- ii) **Безопасность**
Испытания на безопасность могут проводиться на комбинации морских свинок, мышей или свиней.
- iii) **Активность партии**
Образцы АЖВ в окончательной упаковке титруют (\log_{10}) в микротитрационных планшетах для определения титра.
 - **Методика**
 - i) Готовят десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-5} с использованием 0,2 мл восстановленной исследуемой вакцины и 1,8 мл МЕМ. Внутренний положительный контроль ВРРСС следует титровать в соответствующем диапазоне.
 - ii) Вносят 0,1 мл/лунку каждого разведения в пять лунок 96-лучночного планшета, содержащего монослой MARC-145.
 - iii) Планшет инкубируют при 37°C в атмосфере CO_2 в течение 5–7 дней.
 - iv) Планшеты изучают под микроскопом на предмет ЦПД. Внутренний положительный контроль ВРРСС должен дать титр в пределах $0,3 \log_{10}\text{TCID}_{50}$ от предварительно определенного среднего значения.
 - v) Определяют значение TCID_{50} /дозу с помощью метода Спирмена-Кербера. Титр при выпуске должен быть не менее чем на 1,2 log выше, чем титр в испытании на иммуногенность. Значение 1,2 log включает 0,5 log для стабильности в период срока годности продукта и 0,7 log для изменчивости в испытании на активность.

В случае инактивированных вакцин для определения активности конечного продукта могут использоваться испытания с вакцинацией/серологическим исследованием животных-хозяев или лабораторных животных или испытания с вакцинацией/заражением. Параллельные исследования с использованием методов количественного определения антигена с помощью твердофазного ИФА для сравнения стандарта с конечным продуктом можно использовать для определения относительной активности продукта. Стандарт должен продемонстрировать защитное действие у животных-хозяев.

2.3. Требования к регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

- i) **Безопасность у целевых и нецелевых животных**
Для определения безопасности вакцины должны быть проведены полевые исследования. В каждом случае в исследование должны быть включены невакцинированные индикаторные свиньи для мониторинга распространения аттенуированного вируса.
- ii) **Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин**
Необходимо продемонстрировать, что ИВВ не становится снова вирулентным после нескольких пассажей у животных-хозяев, хотя определение вирулентности для такого вируса дать трудно. Известно, что аттенуированные изоляты ВРРСС вызывают вирусемии, и вирус может передаваться восприимчивым животным. Следует показать, что ИВВ не вирулентен у поросят-отъемышей и супоросных

свиноматок при пяти серийных пассажах (до десяти пассажей в зависимости от страны) после ИВВ у восприимчивых свиней при использовании наиболее естественного пути инфицирования.

- iii) Экологические соображения
Не применимо.

2.3.2. Требования к эффективности

- i) Для животноводства

В испытании на иммуногенность ИВВ в наивысшем уровне пассажа для производства должен защищать восприимчивых свиней от вирулентного, не родственного штамма при заражении. Для респираторной формы поросят возраста 3 недель вакцинируют вирусом от наивысшего уровня пассажа после ИВВ. Поросят заражают примерно 10^5 TCID₅₀ вирулентного изолята ВРСС через 2–16 недель для определения защиты от респираторных клинических признаков РСС. Для определения защиты от потерь, связанных с репродуктивной формой РСС, вакцинированных животных заражают на сроке гестации около 85 дней. Для определения того, обеспечивается ли достаточная защита у вакцинированных животных в отношении клинических признаков репродуктивного заболевания, включая мумификацию плодов, мертворождение или рождение ослабленных поросят, по сравнению с контролем, рассчитывают долю свиней, у которых достигнута профилактика, долю потенциальных случаев заболевания РСС, которую удалось снизить вследствие вакцинации, на основе номинальных значений.

Изучение продолжительности иммунитета проводится до регистрации вакцины. Для респираторной формы РСС должно быть показано, что эта продолжительность соответствует достижению свиньями возраста, необходимого для продажи. Продолжительность иммунитета для репродуктивной формы должна составлять период до отъема поросят.

- ii) Для борьбы и искоренения заболевания
Не применимо.

2.3.3. Стабильность

Для всех вакцин изначально устанавливается срок годности 24 месяца. Затем проводятся исследования стабильности в режиме реального времени для подтверждения приемлемости этого срока годности.

Много серий АЖВ должны периодически проходить повторное титрование в течение срока годности для определения изменчивости вакцины. Значение при выпуске должно быть скорректировано, если титры недостаточные или высоко изменчивые.

Инактивированные вакцины, для которых используются испытания на активность *in vivo*, должны пройти повторное испытание в конце срока годности для демонстрации стабильности. Параллельный анализ с использованием твердофазного ИФА с количественным определением антигена должен продемонстрировать стабильность стандарта.

3. Вакцины, основанные на использовании биотехнологических методов

3.1. Существующие вакцины и их преимущества

Вакцины разрабатываются, но пока еще не поступили в продажу.

3.2. Особые требования для биотехнологических вакцин, при их наличии

Не применимо.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BROWN E., LAWSON S., WELBON C., GNANANDARAJAH J., LI J., MURTAUGH M.P., NELSON E.A., MOLINA R.M., ZIMMERMAN J.J., ROWLAND R.R. & FANG Y. (2009). Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clin. Vaccine Immunol.*, **16**, 628–635.
- CHRISTOPHER-HENNINGS J., NELSON E.A., NELSON J.K. & BENFIELD D.A. (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 40–45.
- DEL RUE I., VAN GORP H., VAN DOORSSELAERE J., DELPUTTE P.L. & NAUWYNCK H.J. (2010). Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CD163. *BMC Biotechnol.*, **29**, 48.
- DÍAZ I., VENTEO A., REBOLLO B., MARTÍN-VALLS G.E., SIMON-GRIFÉ M., SANZ A. & MATEU E. (2012). Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 344–348.
- FAABERG K.S., BALASURIYA U.B., BRINTON M.A., GORBALENYA A.E., LEUNG F.C.-C., NAUWYNCK H., SNIJDER E.J., STADEJEK T., YANG H. & YOO D. (2012). Arteriviridae. *In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 796–805.
- FENG L., ZHANG X., XIA X., LI Y., HE S. & SUN H. (2013). Generation and characterization of a porcine endometrial endothelial cell line susceptible to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* **171**, 209–215.
- GARCÍA-NICOLÁS O., BAUMANN A., VIELLE N.J., GÓMEZ-LAGUNA J., QUEREDA J.J., PALLARÉS F.J., RAMIS G., CARRASCO L. & SUMMERFIELD A. (2014). Virulence and genotype-associated infectivity of interferon-treated macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Virus Res.* **179**, 204–211.
- JUSA E.R., INABA Y., KOUNO M., HIROSE O., SHIBATA I., KUBOTA M. & YASUHARA H. (1996). Slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory (PRRS) virus. *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, 749–753.
- KARNIYCHUK U.U., GELDHOF M., VANHEE M., VAN DOORSSELAERE J., SAVELEVA T.A. & NAUWYNCK H.J. (2010). Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet. Res.*, **4**, 30.
- KARNIYCHUK U.U. & NAUWYNCK H.J. (2013). Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Res.*, **44**, 95.
- KITTAWORN RAT A., PRICKETT J., CHITTICK W., WANG C., ENGLE M., JOHNSON J., PATNAYAK D., SCHWARTZ T., WHITNEY D., OLSEN C., SCHWARTZ K. & ZIMMERMAN J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res.*, **154**, 170–176.

KLEIBOEKER S.B., SCHOMMER S.K., LEE S.M., WATKINS S., CHITTICK W. & POLSON D. (2005). Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 165–170.

MURTAUGH M.P. & GENZOW M. (2011). Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine*, **26**, 8192–8204.

MURTAUGH M.P., STADEJEK T., ABRAHANTE J.E., LAM T.T. & LEUNG F.C. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.*, **154**, 18–30.

PROVOST C., JIA J.J., MUSIC N., LÉVESQUE C., LABEL M.È., DEL CASTILLO J.R., JACQUES M. & GAGNON C.A. (2012). Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virol. J.*, **13**, 267.

SCORTTI M., PRIETO C., MARTINEZ-LOBO F.J., SIMARRO I. & CASTRO J.M. (2006). Effects of two commercial European modified-live vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet. J.*, **172**, 506–514.

SHI M., LAM T.T., HON C.C., HUI R.K., FAABERG K.S., WENNBLOM T., MURTAUGH M.P., STADEJEK T. & LEUNG F.C. (2010a). Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res.*, **154**, 7–17.

SHI M., LAM T.T., HON C.C., MURTAUGH M.P., DAVIES P.R., HUI R.K., LI J., WONG L.T., YIP C.W., JIANG J.W. & LEUNG F.C. (2010b). Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.*, **84**, 8700–8711.

SORENSEN K.J., STRANDBYGAARD B., BØTNER A., MADSEN E.S., NIELSEN J. & HAVE P. (1998). Blocking ELISAs for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.*, **60**, 169–177.

STADEJEK T., OLEKSIEWICZ M.B., SCHERBAKOV A.V., TIMINA A.M., KRABBE J.S., CHABROS K. & POTAPCHUK D. (2008). Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch. Virol.*, **153** (8), 1479–1488.

STADEJEK T., STANKEVICIUS A., MURTAUGH M.P. & OLEKSIEWICZ M.B. (2013). Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Vet. Microbiol.*, **26**, 21–28.

TRUS I., BONCKAERT C., VAN DER MEULEN K. & NAUWYNCK H.J. (2014). Efficacy of an attenuated European subtype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs upon challenge with the East European subtype 3 PRRSV strain Lena. *Vaccine*, **32** (25), 2995–3003.

VENTEO A., REBOLLO B., SARRASECA J., RODRIGUEZ M.J. & SANZ A. (2012). A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for

early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol. Methods.*, **181**(1), 109–113.

WESENDORP E., MORGAN S., STOCKHOFE-ZURWIEDEN N., POPMA-DE GRAAF D.J., GRAHAM S.P. & REBEL J.M. (2013). Comparative analysis of immune responses following experimental infection of pigs with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence. *Vet. Microbiol.*, **12**, 1–12.

WERNIKE K., BONILAURI P., DAUBER M., ERRINGTON J., LEBLANC N., REVILLA-FERNÁNDEZ S., HJULSAGER C., ISAKSSON M., STADEJEK T., BEER M. & HOFFMANN B. (2012a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24** (5), 855–866.

WERNIKE K., HOFFMANN B., DAUBER M., LANGE E., SCHIRRMEIER H. & BEER M. (2012b). Detection and typing of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex real-time rt-PCR. *PLoS One.*, **7** (6), 38251.

XIAO Y.H., WANG T.T., ZHAO Q., WANG C.B., LV J.H., NIE L., GAO J.M., MA X.C., HSU W.H. & ZHOU E.M. (2014). Development of Indirect ELISAs for Differential Serodiagnosis of Classical and Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Transbound. Emerg. Dis.*, **61** (4), 341–349.

YOON I.J., JOO H.S., CHRISTIANSON W.T., KIM H.S., COLLINS J.E., MORRISON R.B. & DIAL G.D. (1992). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 144–147.
ZHOU L. & YANG H. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res.* **154** (1–2), 31–37.

ZIMMERMANN J.J., BENFIELD D.A., DEE S.A., MURTAUGH M.P., STADEJEK T., STEVENSON G.W. & Torremorel M. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome Virus (Porcine Arterivirus). *In: Diseases of Swine*, Tenth Edition, Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. eds. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA, 461–486.

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по диагностике репродуктивно-респираторного синдрома 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, реагентов для диагностики и вакцин против репродуктивно-респираторного синдрома свиней, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.