NB: Версия, принятая Всемирной ассамблеей делегатов МЭБ в мае 2015 года

ГЛАВА 3.8.7.

ВИРУС ГРИППА А СВИНЕЙ

РЕЗЮМЕ

Вирусы гриппа А свиней (ВГА-С) вызывают высококонтагиозную вирусную инфекцию свиней. Инфицирование ВГА-С приводит к развитию респираторного заболевания, характеризующегося кашлем, чиханием, выделениями из носа, повышением ректальной температуры, сонливостью, затрудненностью дыхания и снижением аппетита. В некоторых случаях инфицирование ВГА-С сопровождается нарушениями в репродуктивной сфере, такими как аборты. Клинические признаки и выделение вируса с отделяемым полости носа могут появиться в течение 24 ч после инфицирования. Заболеваемость при инфицировании ВГА-С может достигать 100%, но смертность обычно низкая. Вторичная бактериальная инфекция может усугубить клинические признаки при инфицировании ВГА-С. Распространение заболевания происходит путем контакта с содержащими ВГА-С выделениями, такими как отделяемое полости носа и аэрозоль, образующийся при кашле или чихании.

***Идентификация возбудителя**: Образцы для идентификации вируса следует забирать в течение 24–72 ч после появления клинических признаков. Для этого следует выбирать животных, не получавших лечения, в острой фазе заболевания с соответствующими клиническими признаками. Вирус легко обнаружить в ткани легких и мазках из полости носа. Образцы секрета ротовой полости, забираемые с использованием хлопчатобумажных канатов, повешенных в загонах для свиней, также могут использоваться как образцы от групп или популяций животных. Выделение вируса можно проводить на куриных эмбрионах и на стабильных клеточных линиях или первичных культурах клеток. Определить подтип вируса можно с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибирования нейраминидазы на изолятах вируса, или же с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на клиническом материале или на изолятах, а иммуногистохимические исследования можно проводить на фиксированных формалином тканях. Существуют коммерческие наборы для твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) для выявления вирусов гриппа типа А.*

***Серологические реакции**: Исторически первым серологическим методом для выявления антител против ВГА-С была РТГА, проведенная на парных сыворотках. РТГА имеет специфичность в отношении подтипов вируса. В идеале сыворотки следует получить с интервалом 10–21 день. Возрастание титра в четыре или более раза во втором образце по сравнению с первым свидетельствует о недавнем инфицировании ВГА-С. Были описаны и другие серологические методы, такие как иммунодиффузия в агаровом геле, непрямая реакция иммунной флюоресценции, реакция нейтрализации вируса и твердофазный ИФА. По причине возрастания антигенного разнообразия вирусов гриппа типа А свиней и потребности в использовании нескольких типов гемагглютинина (Н) в РТГА наблюдается общая тенденция в отношении использования коммерческих твердофазных ИФА, не обладающих специфичностью в отношении подтипов.*

***Требования к вакцинам**: В продаже имеются инактивированные вакцины против ВГА-С с адъювантами. Вакцины могут содержать один подтип ВГА-С или несколько подтипов. Вакцины должны отражать современный антигенный профиль встречающихся в полевых условиях вирусов, состав подтипов и штаммов в них должен меняться в зависимости от необходимой защиты.*

A. ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа А свиней (ВГА-С) вызывает высококонтагиозную вирусную инфекцию свиней, имеющую существенный экономический эффект в отношении пораженных стад. ВГА-С представляет имеющий оболочку вирус с геномом из сегментированной РНК. Он принадлежит к роду *Influenzavirus A* семейства *Orthomyxoviridae*. Вирусы типа А подразделяются на подтипы на основе белков гемагглютинина и нейраминидазы. Подтипы ВГА-С, чаще всего обнаруживаемые у свиней, включают классический и птичий H1N1, человеческие (hu) H1N1 и H1N2, реассортантный (r) H3N2, а также rH1N2. Среди других подтипов, нечасто обнаруживаемых у свиней – rH1N7, rH3N1, H2N3, птичий (av) H4N6, avH3N3 и avH9N2. Вирусы H1N1, H1N2 и H3N2, обнаруженные в Европе, антигенно и генетически отличаются от таковых, обнаруженных в Америке (Brown, 2013; Karasin *et al*., 2000; 2002; Olsen, 2002; Vincent *et al*., 2009; Webby *et al*., 2004; Zhou *et al*., 1999). В дыхательных путях свиней имеются рецепторы, связывающие вирусы гриппа А свиней, человека и птиц. В результате свиней называют «смесителем» для развития новых вирусов гриппа, в котором вирусы гриппа А свиней, птиц и/или человека претерпевают генетическую перестройку. Инфекции ВГА-С вызывают респираторное заболевание, характеризующееся кашлем, чиханием, выделениями из носа, повышением ректальной температуры, сонливостью, затрудненностью дыхания и снижением аппетита. Среди других возбудителей, которые могут вызывать респираторные заболевания свиней – вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, вирус болезни Ауески (ложное бешенство), респираторный коронавирус свиней, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* и другие бактерии. Однако многие из этих патогенов вызывают другие симптомы, не соответствующие таковым при инфекции ВГА-С. *Actinobacillus pleuropneumoniae* при острой форме инфекции дает клинические признаки, более всего сходные с таковыми при инфекции ВГА-С, такие как диспноэ, тахипноэ, брюшной тип дыхания, кашель, лихорадка, депрессия и анорексия. Клинические признаки и выделение вируса гриппа А с секретом носовой полости появляются в течение 24 ч после инфицирования, и выделение вируса обычно прекращается через 7–10 дней после инфицирования. У свиней существует две формы заболевания, эпидемическая и эндемическая. При эпидемической форме вирус быстро проходит через все фазы свиноводческого хозяйства при быстром выздоровлении животных в случае отсутствия таких осложняющих факторов, как вторичная бактериальная инфекция. При эндемической форме клинические признаки могут быть менее явными, и не все свиньи имеют типичные клинические признаки инфекции. Заболеваемость при инфицировании ВГА-С может достигать 100%, при этом смертность обычно низкая. Основной экономический эффект связан с замедлением прибавки массы тела, что приводит к увеличению срока достижения продажного веса. Вирус передается при контакте с содержащими ВГА-С выделениями, такими как отделяемое носовой полости и аэрозоль, образующийся при кашле или чихании. Может иметь место инфицирование человека ВГА-С, и есть сообщения о небольшом количестве смертельных случаев (Lindstrom *et al*., 2012; Myers *et al*., 2007). Следует соблюдать меры предосторожности для профилактики инфицрования человека, как описано в главе 1.1.4. *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*. И наоборот, вирусы гриппа типа А могут иногда передаваться от человека свиньям. Аналогично, вирусы гриппа могут также иногда передаваться от птицы свиньям, а также от свиней птице, особенно индейкам. Весной 2009 г. новый вирус H1N1 (H1N1pdm09) был обнаружен у людей в Западном полушарии. Этот новый вирус состоял целиком из генов ВГА-С, но имел сложную эволюционную историю. Гены матрикса и нейраминидазы происходили от европейского ВГА-С H1N1 птичьей линии, а остальные гены – от североамериканского ВГА-С линии, поражающей свиней, птиц и человека. Вирус H1N1pdm09 быстро распространяется по миру в результате передачи от человека человеку. Помимо постоянной циркуляции у людей,

иногда одновременно отмечаются случаи заболевания у свиней как в Северном, так и в Южном полушарии, и вирус стал эндемичным во многих популяциях свиней во всем мире. Затем H1N1pdm09 гибридизировал с другими ВГА-С внес свой вклад в новые геномные конфигурации вирусов во всем мире.

B. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. *Методы исследований для диагностики ВГА-С и их целевое назначение*

Метод	**Цель**					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя[1]						
Выделение вируса	+	+++	++	+++	++	-
ПЦР ОТ в реальном времени	+++	+++	+++	+++	+++	-
Традиционная ПЦР	-	-	-	++	-	-
Выявление иммунной реакции						
РТГА	+	+	+	++	++	+++
Твердофазный ИФА	+++	+++	+++	+	+++	+

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; нп = не применимо.

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; РТГА = реакция торможения гемагглютинации; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; обратите внимание, что анализ антигенов с помощью твердофазного ИФА предназначен для использования у животных с клиническими признаками заболевания. Надежность этого метода при использовании у клинически здоровых животных вызывает сомнения.

1. Идентификация возбудителя

Поскольку ВГА-С потенциально патогенен для человека, все работы с потенциально заразительными диагностическими образцами, куриными эмбрионами и культурами клеток должны проводиться в помещении класса II биобезопасности. При работе с инфицированными свиньями следует использовать дополнительные меры предосторожности (средства индивидуальной защиты), такие как респираторы и защитные приспособления для глаз.

1.1. Культивирование

1.1.1. Обработка образцов

Легкие можно обработать для выделения вируса различным образом, например, путем промывания стерильными средами, перечисленными ниже, мацерации ткани с использованием пестика и ступки или гомогенизатора, или путем измельчения скальпелем

[1] Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя в некоторых ситуациях.

или ножницами. Обработка ткани проводится в культуре клеток с добавлением антибиотиков (например, в 10-кратной рабочей концентрации), при итоговой концентрации 10–20% (масса/объем). Мазки переносят в среду для культуры клеток или фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавкой антибиотиков и сывороточного альбумина крупного рогатого скота (5 мг/мл). Сыворотку крупного рогатого скота не используют. Использование секрета ротовой полости может потребовать изменения метода обработки образца, применяемого в случае мазков из полости носа, в связи с вязкостью образца и повышенной вероятностью контаминации бактериями. Идеальным вариантом является отправка образцов в диагностическую лабораторию в течение ночи на влажном льду, без замораживания (указания по забору образца и его транспортировке см. по адресу: http://offlu.net). После получения в лаборатории мазки из полости носа интенсивно размешивают вручную или с помощью вортекса. Мазки из носа и материал легких центрифугируют при 1500–1900 ***g*** в течение 15–30 мин при температуре 4°C. Забирают надосадочную жидкость и хранят ее до посева при температуре 4°C. Если срок хранения надосадочной жидкости до посева составляет более 24 ч, ее следует хранить при температуре -70°C или более низкой. Надосадочную жидкость от образцов легких высевают без дальнейшего разведения. Надосадочную жидкость от мазков и секрета ротовой полости также можно высевать без разведения или разводить 1/3 в среде для культуры клеток. Для снижения контаминации бактериями к среде для культуры клеток добавляют антибиотики, использованные при обработке образца, и/или фильтруют надосадочную жидкость, но это может снизить титр вируса. Для фильтрования рекомендуется использовать мембрану с низкой адсорбцией белка, такую как мембрана PVDF, с целью минимизации потери вируса. В качестве альтернативы препарат вируса перед посевом в эмбрионы или культуру клеток можно обработать антибиотиками, такими как гентамицин (100 мкг/мл) или пенициллин (10 000 ед./мл стрептомицин (10 000 ед./мл) и 2% фунгизон (250 мг/мл) в течение 30–60 мин при температуре 4°C.

1.1.2. Выделение вируса в культуре клеток

i) Выделение вируса можно проводить в клеточных линиях и первичной культуре клеток, восприимчивых к инфицированию вирусом гриппа A. Клетки почек собак Мадин-Дарби (MDCK) являются пермиссивными для широкого спектра различных подтипов и штаммов ВГА-С и поэтому представляют собой предпочтительную линию клеток, но можно также использовать и первичную культуру клеток почек свиней, семенника свиней, легкого свиней или клетки трахеи свиней.

ii) Сомкнутые монослои клеток промывают (через 48–72 ч после посева) три раза средой для культуры клеток, содержащей итоговую концентрацию 1 мкг/мл обработанного ТФХМ[2] трипсина; однако концентрация зависит от типа трипсина и использованных клеток (можно использовать концентрации 0,3–10 мкг/мл). В среду для культуры клеток можно добавить антибиотики, но не допускается добавление сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота.

iii) В культуру клеток высевают соответствующее количество промывной жидкости, суспензии ткани, секрета ротовой полости или надосадочной жидкости от мазка. Примечание: объем инокулума зависит от размера сосуда с культурой клеток. Обычно высевают 100–200 мкл в каждую лунку 24-луночного планшета для культуры клеток, 1 мл в каждую пробирку Лейтона и 0,5–2 мл в колбу емкостью 25 см^2.

iv) Инокулированные культуры клеток инкубируют в течение 1–2 ч при 37°C при периодическом покачивании. Если используются открытые сосуды для культуры

[2] ТФХМ: тозилфенилаланилхлорметан.

клеток, такие как планшеты для культуры клеток, инкубацию проводят во влажном инкубаторе с 5% CO_2.

v) Отбрасывают инокулум и промывают монослои клеток три раза средой для культуры клеток, содержащей трипсин.

vi) Во все сосуды добавляют соответствующий объем поддерживающей среды для культуры клеток и инкубируют при 37°C в течение 3–7 дней при периодическом изучении на предмет цитопатического действия (ЦПД). Если в конце периода инкубации ЦПД не наблюдается, сосуд с культурой клеток можно заморозить при -70°C или при более низкой температуре, оттаять и сделать слепой пассаж, как описано выше (этап iii). Если ЦПД наблюдается, то аликвоту среды для культуры клеток можно испытать на гемагглютинирующие вирусы или с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ) на предмет консервативных генов вируса гриппа, таких как нуклеопротеин или матрикс, и эту жидкость можно забрать и использовать как инокулят для подтверждения с помощью метода флюоресцирующих антител (см. раздел B.1.5 ниже). Для этого можно произвести посев на покровные стекла (пробирки Лейтона, 24-луночный планшет для культуры клеток) или стекла с камерами с монослоями MDCK (или другими соответствующими клетками). Выделение проводят по описанному выше методу (этап iii). В некоторых случаях может потребоваться десятикратное разведение вируса из культуры клеток для достижения соответствующего ЦПД на покровных стеклах. Подтипы вируса гриппа можно определить с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибирования нейраминидизы (NI), или с помощью ПЦР ОТ с праймерами, валидированными для чувствительной и специфичной амплификации отдельных генов HA и NA (Chiapponi *et al.*, 2012; Nagarajan *et al.*, 2010;). Однако необходимо провести валидацию с использованием эндемичных циркулирующих в регионе штаммов, чтобы обеспечить пригодность этих методов, поскольку эндемичные штаммы ВГА-С могут генетически различаться в разных регионах.

1.1.3. Посев в куриные эмбрионы (Senne, 1998)

i) Используют яйца с эмбрионами возраста 9–11 дней (Senne, 1998).

ii) В аллантоисную и амниотическую полости вводят 0,1–0,3 мл инокулума; многие лаборатории проводят посев только в аллантоисную полость, при сходной чувствительности. Обычно один образец высевают в 3–4 яйца.

iii) Яйца инкубируют при 35–37°C в течение до 5 дней при освещении в течение дня. Яйца с эмбрионами, погибшими в течение 24 ч после посева, отбрасывают (считается, что их гибель связана с травмой, полученной в процессе инокуляции).

iv) Яйца с эмбрионами, погибшими более чем через 24 ч после инокуляции, охлаждают. В конце периода инкубации из яиц с погибшими эмбрионами и из яиц с живыми эмбрионами забирают амниотическую и аллантоисную жидкость. Все материалы яиц считаются потенциально заразительными, и с ними следует работать соответствующим образом, чтобы не допустить контакта работников лаборатории с ВГА-С.

v) Жидкости центрифугируют при 1500–1900 ***g*** в течение 10–20 мин при температуре 4°C. Надосадочную жидкость переносят в другую пробирку для изучения.

vi) Жидкости оценивают на предмет наличия ВГА-С на основе реакции гемагглютинации (РГА) (см. ниже).

vii) Делают новые пассажи (1–2) жидкостей, не продемонстрировавших гемагглютинирующей активности (отрицательных в отношении ВГА-С), в яйца или линии клеток, как описано выше. Выделение может быть лучшим, если сделать десятикратные разведения жидкости в среде для культуры клеток.

1.1.4. Реакция гемагглютинации

i) Готовят 0,5% суспензию эритроцитов из крови индюков или цыплят. Цельную кровь переносят в пробирку и добавляют ФСБ. Например, в центрифужную пробирку на 50 мл помещают 10–20 мл цельной крови и объем доводят до метки ФСБ. Осторожно переворачивают пробирку несколько раз, чтобы промыть эритроциты. Центрифугируют при 800 ***g*** в течение 10 мин в центрифуге с охлаждением. Отсасывают ФСБ и лейкоцитарную пленку (слой лейкоцитов) из пробирки. Наполняют пробирку свежим ФСБ и тщательно ресуспендируют эритроциты. Повторяют цикл промывки и центрифугирования еще два раза. По завершении промывки вносят в ФСБ количество эритроцитов, достаточное для получения 0,5% раствора. Некоторые штаммы вируса в большей или меньшей степени лучшую агглютинацию дают на крови индюков, а не цыплят. Поэтому может потребоваться выбрать тип эритроцитов на основе штаммов, циркулирующих в данном регионе. Промытые эритроциты и 0,5% суспензию эритроцитов можно хранит при температуре 4°C в течение до 1 недели. При наличии гемолиза эритроциты отбрасывают.

ii) Помещают 50 мкл ФСБ в лунки 8–12 одного ряда 96-луночного микротитрационного планшета с V- или U-образным дном для каждого неизвестного вируса. Еще один ряд лунок должен служить положительным контролем.

iii) В первую лунку каждого ряда вносят 50 мкл неразведенного изолята.

iv) Делают серийные разведения изолята с помощью микропипетки, установленной на объем 50 мкл. Полученные разведения составят от 1/2 (лунка 1) до 1/2048 (лунка 11). Лунка 12 содержит только ФСБ и служит клеточным контролем.

v) В каждую лунку вносят 50 мкл 0,5% суспензии эритроцитов и осторожно встряхивают планшет для размешивания. Примечание: в процессе внесения эритроциты должны быть хорошо суспендированы.

vi) Планшет накрывают пленкой и инкубируют при комнатной температуре (24°C) или при 4°C до появления отчетливого сгустка (30–60 мин) в лунке отрицательного контроля.

vii) В лунках с полной гемагглютинацией (положительный результат РГА, наличие ВГА-С) эритроциты расположены по всей лунке в виде «пленки». Лунки с отчетливым сгустком эритроцитов на дне лунки не имеют гемагглютинирующей активности (отсутствие ВГА-С). Неполная гемагглютинация выглядит как частичный сгусток, характеризующийся размытыми краями или «пончикообразный». В случае сомнений при интерпретации результата как отрицательного результата или как неполного ингибирования наклоните микротитрационный планшет под углом около 45 градусов на 20–30 секунд и посмотрите на текущую жидкость: в лунках, где нет гемагглютинации, есть капля прозрачной жидкости. В лунках с частичным ингибированием такой жидкости нет.

1.2. Типирование изолятов вируса гриппа А свиней (ВГА-С)

1.2.1. Реакция торможения гемагглютинации

i) Эталонные гемагглютинирующие (ГА) антигены (H1, H3 и др.) разводят до концентрации 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) на 50 мкл (4 ГАЕ/25 мкл) в 0,01 М ФСБ, pH 7,2–7,4. Эталонные антигены должны соответствовать штаммам, активно циркулирующим в районе, где содержатся свиньи. Указания в отношении эталонных антигенов можно получить в референтной лаборатории МЭБ для данного региона.

ii) Стандартизируют неизвестные вирусы гриппа А таким образом, чтобы они содержали 8 ГАЕ в 50 мкл.

iii) Проводят обратное титрование (РГА) для всех неизвестных изолятов и подтипов антигенов H для обеспечения надлежащего значения ГАЕ. Обратное титрование проводится в соответствии с описанием процедуры РГА, за исключением того, что вместо одиннадцати разведений в лунках используется шесть.

iv) Каждую эталонную сыворотку (специфичную для отдельного подтипа ГА и представляющую активно циркулирующие в регионе вирусы) обрабатывают RDE (рецептороразрушающий фермент); добавляют 50 мкл сыворотки к 200 мкл RDE (разведение 1/10 в физиологическом растворе с сульфатом магния и хлоридом кальция, что соответствует 100 единицам на 1 мл). Инкубируют в течение ночи (12–18 ч) на водяной бане при 37°C. Добавляют 150 мкл 2,5% раствора цитрата натрия и нагревают для инактивации при 56°C в течение 30 мин. Объединяют 200 мкл обработанного образца и 25 мкл ФСБ. Примечание: обработка RDE рекомендуется, поскольку она снижает неспецифические реакции и способствует идентификации изолятов H1N2 H3N2.

v) Естественные агглютинины из сывороток удаляют путем обработки разведенной сыворотки 0,1 мл упакованных отмытых эритроцитов на 1 мл разведенной сыворотки. Инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре, периодически помешивая для поддержания эритроцитов в суспендированном состоянии. Обработанную сыворотку центрифугируют при 800 g в течение 10 мин и забирают надосадочную жидкость.

vi) Помещают 25 мкл стандартизированного антигена (неизвестный изолят или антиген положительного контроля) в три лунки 96-луночного микротитрационного планшета с V- или U-образным дном. Вносят 50 мкл ФСБ в несколько лунок, которые будут служить контролем эритроцитов. Примечание: вместо 25 мкл стандартизированного антигена можно использовать 25 мкл ФСБ.

vii) Добавляют 25 мкл соответствующей эталонной сыворотки в первую лунку для исследуемого подтипа H. Делают серийные разведения антисыворотки в объеме 25 мкл в лунках антигена, установив пипетку на объем 25 мкл. Эту процедуру повторяют для каждого исследуемого подтипа H. Примечание: если на этапе vi использовано 25 мкл ФСБ вместо 25 мкл стандартизированного антигена, добавляют 25 мкл стандартизированного антигена в каждую лунку, содержащую эталонную сыворотку.

viii) Планшеты накрывают и инкубируют при комнатной температуре в течение 10–30 мин.

ix) В каждую лунку добавляют 50 мкл 0,5% суспензии эритроцитов и осторожно встряхивают планшеты для размешивания. В процессе внесения эритроциты поддерживают в суспендированном состоянии.

x) Накрывают планшеты пленкой и инкубируют при комнатной температуре (24°C) или 4°C до образования отчетливого сгустка в лунках положительного контроля (обычно 30–60 мин). Примерно через 20 мин инкубации осматривают планшеты на предмет признаков гемагглютинации, поскольку некоторые изоляты могут начать элюировать (отделяться от эритроцитов) через 30 мин.

xi) Результаты интерпретируют, как описано выше для РГА. Образец считается положительным в отношении специфического подтипа H, если гемагглютинация подавляется. Испытание считается действительным, если положительный эталонный антиген и его гомологичная антисыворотка демонстрируют ожидаемый титр РТГА и обратное титрование каждого антигена (неизвестного и положительного контроля) дает 4 или 8 ГАЕ. Если эти условия не выполняются, испытание следует повторить.

xii) Если эритроциты в лунках клеточного контроля не осаждаются с образованием хорошо выраженного сгустка, в качестве возможных причин проверяют

следующие: отклонения в составе ФСБ, слишком сильное испарение из планшетов, эритроциты слишком старые, отклонения в концентрации эритроцитов.

1.2.2. Реакция ингибирования нейраминидазы

Надежная идентификация подтипа на основе реакции ингибирования нейраминидазы не входит в область деятельности многих лабораторий. Референтные лаборатории могут дать консультации в отношении N-типирования изолятов.

1.3. Реакция иммунной флюоресценции

1.3.1. Методика

i) Этот метод можно использовать для срезов ткани, покровных/предметных стекол или 96-луночных планшетов с инфицированными монослоями клеток (Vincent *et al.*, 1997). Во всех процедурах окрашивания должен использоваться положительный и отрицательный контроль.

ii) Обратите внимание, что этот метод сильно зависит от использования эталонных реактивов, представляющих вирусы, циркулирующие в данном регионе, и от обученного интерпретации результатов персонала, способного отличить положительный результат от фонового окрашивания (специфичность). Этот метод обнаружения вируса имеет меньшую чувствительность по сравнению с другими существующими методами, такими как ПЦР.

iii) Инокулированные клетки инкубируют в течение соответствующего периода времени для того, чтобы обеспечить продуктивное инфицирование вирусом 10–25% клеток. Покровное или предметное стекло однократно промывают ФСБ, помещают в 100% ацетон на 5–10 мин и сушат на воздухе. Ацетон следует использовать в вытяжном шкафу.

iv) Готовят срезы замороженных тканей на предметных стеклах. Фиксируют стекла в ацетоне в течение 5–10 мин и сушат на воздухе.

v) Наносят конъюгат (меченые флюоресцеином антитела к ВГА-С) и инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 30 мин. Рекомендуется включать в состав конъюгата эванс голубой для контрастного окрашивания.

vi) Промывают ФСБ, pH 7,2, оставляют на 5–10 мин в свежем ФСБ, промывают дистиллированной водой и сушат на воздухе.

vii) Покровные стекла помещают на предметные стекла клетками вниз в жидкость для монтирования. Удаляют резиновую прокладку со стекла с камерами и добавляют жидкость для монтирования, после чего накрывают покровным стеклом. Жидкость для монтирования, а затем покровное стекло также помещают на срезы ткани на предметном стекле. Если используются 96-луночные планшеты, среда для монтирования и покровные стекла не требуются.

viii) Окрашенные стекла изучают в затемненной комнате с использованием УФ-микроскопа. Клетки, инфицированные ВГА-С, обнаруживаются по наличию яркой светло-зеленой флюоресценции. Рекомендуется, чтобы лицо, изучающее стекла, получило обучение в отношении интерпретации результатов окрашивания стекол флюоресцеином, поскольку такая интерпретация представляет трудности. При изучении неизвестных материалов следует использовать стекла положительного и отрицательного контроля для подтверждения того, что процедура испытания работает, а также для использования в качестве основы для дифференциации положительного (ВГА-С) результата окрашивания и отрицательного (фонового) окрашивания. Также важно использовать антитела, способные распознавать все возможные вирусы, циркулирующие в данном районе (например, пан-антитела к нуклеопротеину гриппа А).

1.4. Иммуногистохимический метод (Vincent *et al.*, 1997)

1.4.1. Методика

i) Делают срезы фиксированного формалином заключенного в парафин легкого толщиной 4 мкм и помещают их на покрытые поли-L-лизином предметные стекла (можно использовать готовые имеющиеся в продаже стекла, которые, по мнению некоторых исследователей, лучше покрытых лизином стекол). Во все исследования должны быть включены ткани положительного и отрицательного контроля.

ii) Стекла нагревают при 60°C в течение 15 мин, удаляют парафин и переводят в водную фазу, погружая с серию понижающихся концентраций этанола, а затем в дистиллированную воду.

iii) Обрабатывают образцы 3% перекисью водорода в течение 10 мин и два раза промывают дистиллированной водой.

iv) Обрабатывают образцы 0,05% протеазой в течение 2 мин и промывают два раза по 2 мин в 0,1 М буфере Трис/ФСБ, pH 7,2, при комнатной температуре.

v) На каждое стекло наносят первичные мышиные анти-ВГА-С моноклональные антитела (направленные против вирусного нуклеопротеина) и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч или ночи при 4°C. Стекла промывают буфером Трис/ФСБ.

vi) Наносят вторичные антитела (биотинилированные козьи антимышиные антитела) и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Промывают буфером Трис/ФСБ.

vii) Наносят третичные антитела (конъюгированный с пероксидазой стрептавидин) на 10 мин при комнатной температуре. Промывают буфером Трис/ФСБ.

viii) Наносят раствор диаминобензидина тетрагидрохлорида на 5 мин при комнатной температуре. Два раза промывают дистиллированной водой.

ix) Производят контрастное окрашивание гематоксилином Гилла в течение 10–30 секунд, промывают в воде в течение 2 мин, обезвоживают, просветляют и накрывают покровными стеклами.

x) Инфицированные ВГА-С ткани обнаруживаются по коричневому окрашиванию бронхиолярного эпителия и пневмоцитов.

1.5. Твердофазный иммуноферментный анализ по методу «антигенной ловушки»

Твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) по методу «антигенной ловушки» типа А и мембранный иммуноферментный анализ являются коммерчески доступными методами детекции вирусов гриппа человека и животных. Эти типы методов используются для выявления ВГА-С в ткани легких и мазках из полости носа (Swenson *et al.*, 2001). Такие исследования обычно выполняют компании, работающие в области медицины и ветеринарии. Эти методы имеют тенденцию к меньшей чувствительности по сравнению с другими методами, такими как ПЦР.

1.6. Полимеразная цепная реакция

Высоко консервативные белок матрикса и нуклеопротеин являются наилучшими мишенями для скрининга на инфицирование ВГА-С с помощью ПЦР ОТ. После выявления нового (пандемического) вируса H1N1 в 2009 г. молекулярный анализ, основанный на ПЦР в формате реального времени для матрикса птичьего гриппа (Spackman *et al.*, 2002), был адаптирован для использования у свиней (Brookes *et al.*, 2009; Slomka *et al.*, 2010). Модификации этого метода варьируют в разных странах, и за информацией о наиболее подходящем методе ПЦР матрикса можно обратиться в референтную лабораторию по гриппу свиней.

Метод ПЦР ОТ в формате реального времени для ВГА-С, описанный в данной главе, имеет мишенью ген матрикса (М) вирусов гриппа А. Набор праймер/зонд матрикса относится к квазимножественной ПЦР ОТ в формате реального времени, использующей один прямой праймер, зонд и два обратных праймера. Два обратных праймера позволяют

генетически обнаружить евразийскую, североамериканскую и пандемическую 2009 г. линии матрикса H1N1.

ПЦР ОТ в формате реального времени представляет собой одноэтапную процедуру. Специфические праймеры позволяют амплифицировать целевой участок (см. таблицу 2). Непродлеваемые флюорогенные гидролитические зонды позволяют измерить целевой ПЦР-продукт, образующийся в каждом цикле ПЦР. Зонды метятся на 5'-конце репортерным красителем, а на 3'-конце – нефлюоресцентным гасителем. После гибридизации зонда с целевой последовательностью 5'-нуклеазная активность Taq-полимеразы приводит к гидролизу зонда и отделению гасителя от репортерного красителя. Это приводит к флюоресценции отделенного репортерного красителя, которая обнаруживается спектрофотометрически и регистрируется. Регистрируется количество флюоресценции, и количество циклов детекции пропорционально количеству целевой матрицы в образцах.

Для этой процедуры критически важно иметь отдельные помещения для приготовления и оборудование для экстракции нуклеиновых кислот, трансфера РНК и приготовления исходной смеси. Требуется «чистое» пространство для приготовления реактивов, используемых для ПЦР, свободное от амплифицированной с-ДНК или РКН образца.

Таблица 2. *Последовательности гидролитического зонда и праймеров матрикса ВГА-С*

Специфичность	**Описание**	**Последовательность**
Матрикс (любой вирус гриппа А)	Праймер M+25*5'	5'-AgA TgA gTC TTC TAA CCg Agg TCg-3'
	Зонд M+64*	5'-FAM-TCA ggC CCC CTC AAA gCC gA-BHQ-1-3'
	Праймер M-124*3'	5'-TgC AAA AAC ATC TTC AAg TCT CTg-3'
	Праймер M-124*SIV 3'**	5'-TgC AAA gAC ACT TTC CAg TCT CTg-3'

*Относится к расположению нуклеотида, где 5'– конец зонда или праймера отжигается на геном.

**Праймер для детекции матрикса пандемического H1N1 2009 г.

i) Экстрагируют нуклеиновую кислоту из образца. Для подтверждения успешности экстрагирования необходимо использовать положительный и отрицательный контроль экстрагирования (ПКЭ и ОКЭ, соответственно).
ii) Готовят исходную смесь для ПЦР ОТ в «чистом» помещении для ПЦР (таблица 2).
iii) Помещают аликвоты 17 мкл реакционной смеси в каждую лунку 96-луночного планшета. Переносят 8 мкл матричной РНК для каждой реакции в соответствующее помещение для трансфера РНК. При использовании 96-луночного планшета для защиты дна планшета от царапин, отпечатков пальцев и прилипания посторонних частиц, что может повлиять на оптическую систему и изменить результат флюоресценции, используют подставку.
    a) Для проверки того, что ПЦР и экстрагирование РНК успешны, в цикл ПЦР необходимо включить следующие контроли: положительный контроль экстрагирования (ПКЭ), отрицательный контроль экстрагирования (ОКЭ), положительный контроль амплификации (ПКА) и отрицательный контроль амплификации (ОКА). ПКА разводят в каждой диагностической лаборатории, и он должен иметь значение Ct в диапазоне 21–29, чтобы цикл был действительным.
iv) Образцы помещают в термоциклер и включают его при соответствующих параметрах.
v) Анализируют результаты. Цикл ПЦР будет действительным, если:
    a) Значение C_t для ПКА составляет 21–29.

b) ПКЭ дал положительный результат.
c) ОКЭ и ОКА дали отрицательный результат.
d) Все образцы и контроли, продемонстрировавшие положительный результат, имеют «сигмоидную кривую».
e) Если вышеперечисленные условия не выполняются, исследование необходимо повторить.

Таблица 2. *Пример исходной смеси для ПЦР ОТ в формате реального времени для набора для одноэтапного процесса*

Компонент	**Итоговая концентрация**	**Объем на реакцию (мкл)**
H_2O	-	0,83
2 × буфер ПЦР ОТ	1 ×	12,5
Праймер M+25 5’ (20 мкМ)	200 нМ	0,25
Праймер M-124 3’ (20 мкМ)	200 нМ	0,25
Праймер M-124 SIV 3’ (20 мкМ)	200 нМ	0,25
25 × смесь ферментов ПЦР ОТ	1 ×	1
Зонд M+64 (6 мкМ)	60 нМ	0,25
Усилитель детекции (15 ×)	1 ×	1,67
Матрица	-	8
Общий реакционный объем	**-**	**25**

Таблица 3. *Примерные параметры термоциклера*

Этап	**Циклы**	**Операция**	**Время**	**Температура**
1	1		10 минут	45°C
2	1		10 минут	95°C
3	45	Денатурация	1 секунда	94°C
		Отжиг*	30 секунд	60°C
		Элонгация	15 секунд	72°C

*Накопление флюоресценции.

Подтип изолятов вируса может быть определен с использованием традиционных методов или ПЦР в формате реального времени, которая позволяет дифференцировать генетически различающиеся вирусы H1 от других известных штаммов (Chiapponi *et al*., 2012). Дифференциальная ПЦР в формате реального времени все чаще используется во многих регионах. Диагностческие образцы для матричной ПЦР также можно субтипировать с использованием субтипирующей ПЦР. Образцы с высокими матричными CT могут не поддаваться детекции при субтипирующей ПЦР, и может потребоваться попытка выделения вируса до идентификации подтипа. Реактивы для скрининга и субтипирующей ПЦР имеются в продаже, однако лаборатории должны обеспечить возможность выявления циркулирующих в настоящее время в данном районе вирусов гриппа. Во многих случаях необходимо провести частичное или полное секвенирование одного или более генов ВГА-С (т.е. нейраминидазы, гемагглютинина), чтобы быть уверенными в подтипе выявленного вируса. Кроме того, для определения и мониторинга разнообразия вируса все чаше используется генотипирование вируса на основе секвенирования нескольких или всех генных сегментов. Методы следует валидировать для региона, в котором они должны применяться, с учетом изменчивости ВГА-С в мире.

2. Серологические реакции

Основным серологическим методом для выявления антител к ВГА-С является РТГА, обладающая специфичностью в отношении подтипов. Эталонные антигены должны отражать циркулирующие в данном регионе вирусы и быть как можно более широко реактивными в отношении специфического подтипа. Исследование следует проводить на парных сыворотках, забранных с интервалом 10–21 день. Нарастание титра в четыре или более раза в период между забором первого и второго образца свидетельствует о недавнем инфицировании ВГА-С. Другими серологическими методами, которые описаны, но не часто используются, являются нейтрализация вируса, иммунодиффузия в агаровом геле и непрямая реакция иммунной флюоресценции. Твердофазный ИФА для выявления антител к ВГА-С описан в литературе, и в продаже имеются коммерческие наборы (Barbé *et al*., 2009; Ciacci-Zanella *et al*., 2010).

2.1. Реакция торможения гемагглютинации

2.1.1. Методика

i) Эталонные ГА антигены (H1, H3 и др.) разводят до концентрации 4–8 ГАЕ/25 мкл в 0,01 М ФСБ, pH 7,2.

ii) *Исследование для H1N1:* Инактивированные сыворотки нагревают в течение 30 мин при 56°C. Разводят 1/10 в ФСБ. Добавляют 0,1 мл упакованных отмытых эритроцитов к 1 мл инактивированной нагреванием разведенной сыворотки и размешивают. Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин при периодическом встряхивании каждые 10–15 мин. Центрифугируют при 800 ***g*** в течение 10 мин при 4°C. Примечание: сыворотки можно обработать RDE и эритроцитами, как описано ниже для этапа iii, в качестве альтернативы инактивации нагреванием и обработке упакованными эритроцитами. Хотя использование RDE рекомендуется, могут быть региональные различия в отношении его использования для обработки сывороток в зависимости от специфичности сывороток для некоторых антигенов, используемых в РТГА.

iii) *Исследование для H1N2 и H3N2*: добавляют 50 мкл сыворотки к 200 мкл RDE (разведение 1/10 в физиологическом растворе с сульфатом магния и хлоридом кальция, что соответствует 100 единицам на 1 мл). Инкубируют в течение ночи (12 - 18 ч) на водяной бане при 37°C. Добавляют 150 мкл 2,5% раствора цитрата натрия и нагревают для инактивации при 56°C в течение 30 мин. Объединяют 200 мкл обработанного образца и 25 мкл ФСБ. Добавляют 50 мкл 50% эритроцитов. Встряхивают и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Центрифугируют при 800 ***g*** в течение 10 мин при температуре 4°C.

iv) Помещают 50 мкл обработанной сыворотки в две лунки 96-луночного планшета с V- или U-образным дном. Помещают 25 мкл обработанной сыворотки в две лунки, используемые как контроль сыворотки. Сыворотки положительного и отрицательного контроля обрабатывают так же, как и неизвестные сыворотки.

v) Помещают 25 мкл ФСБ в лунки контроля сыворотки и все пустые лунки, за исключением двух лунок, являющихся лунками клеточного контроля. Добавляют 50 мкл ФСБ в лунки клеточного контроля.

vi) Делают серийные двойные разведения сыворотки в объемах 25 мкл на планшете и затем добавляют 25 мкл соответствующего антигена во все лунки, за исключением лунок контроля сыворотки и лунок клеточного контроля.

vii) Закрытые планшеты инкубируют при комнатной температуре (24°C) или 4°C в течение 30–60 мин.

viii) Добавляют 50 мкл 0,5% суспензии эритроцитов в каждую лунку, встряхивают и инкубируют при комнатной температуре (24°C) или 4°C в течение 20–30 мин до образования отчетливого сгустка на дне лунок клеточного контроля. В процессе внесения поддерживают эритроциты в суспендированном состоянии.

ix) Проводят РГА с использованием антигенов для РТГА перед и одновременно с проведением РТГА для проверки приемлемости концентраций антигенов.
x) Испытание действительно, если гемагглютинации не наблюдается в лунке контроля сыворотки, нет ингибирования гемагглютинации в отрицательной сыворотке, положительная сыворотка имеет ожидаемый титр РТГА и обратное титрование ГА дает значение 4–8 ГАЕ на 25 мкл.

2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (Barbé *et al.*, 2009; Ciacci-Zanella *et al.*, 2010)

Метод твердофазного ИФА для выявления антител (против ВГА-С) описан в литературе, и в продаже есть наборы для твердофазного ИФА.

C. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

Указания по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Представленные здесь и в главе 1.1.8 указания являются общими и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

1.1. Обоснование и предполагаемое использование препарата

Инфекция ВГА-С может оказывать существенное экономическое воздействие на производителей в связи со снижением потребления корма в период болезни, что приводит к снижению прибавки массы тела, увеличению продолжительности периода до достижения продажных кондиций и понижению эффективности кормления. В регионах, где практикуется вакцинация, вакцина используется для снижения экономического воздействия заболевания путем снижения тяжести и продолжительности клинических признаков. Кроме того, вакцины могут снижать уровень выделения вируса из организма и продолжительность выделения вируса. Снижение количества выделенного вируса и продолжительности выделения вируса может быть важным для снижения передачи вируса при минимизации риска экспозиции для свиней и людей.

2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Штаммы, используемые для производства вакцины, должны быть антигенно близкими к штаммам ВГА-С, циркулирующим в полевых условиях. Для выбора можно использовать реакцию торможения гемагглютинации, реакцию нейтрализации, демонстрирующие перекрестную реактивность между антисыворотками от свиней, вакцинированных штаммами, являющимися кандидатами для производства вакцины, и штаммами, выделенными в полевых условиях.

Информация о вакцинном вирусе должна быть хорошо задокументирована, включая источник и историю пассажей вируса. Должны быть установлены все отличительные характеристики, такие как подтипы гемагглютинина и нейраминидазы. Для определения подтипов H и N можно использовать реакцию торможения гемагглютинации и ингибирование нейраминидазы специфичными для подтипов антисыворотками или ПЦР ОТ в формате реального времени и секвенирование. Кроме того, можно нейтрализовать аликвоты исходного вакцинного вируса (ИВВ) специфической антисывороткой, т.е. антисывороткой против H1 или H3 ВГА-С, а затем инокулировать в аллантоисную полость 10-дневных куриных эмбрионов или восприимчивые клеточные линии, такие как клеточная линия MDCK. Аллантоисную жидкость или надосадочную жидкость культуры клеток забирают через 72–96 ч после инокуляции и изучают на предмет активности ГА.

Принадлежность к данному подтипу определяется по отсутствию активности ГА в нейтрализованном посевном материале и наличию активности ГА в не нейтрализованном посевном материале. Должны быть подтверждены значительные антигенные отличия данного штамма, отличающие его от других представителей этого подтипа, которые могут благоприятно влиять на его использование для производства вакцины.
Следует изучить факторы, которые могут привести к нестабильности при производстве, такие как репликация на необычной клеточной линии. Если при производстве делается пять пассажей исходного вакцинного вируса, может потребоваться секвенирование генов H и N для максимального пассажа, чтобы подтвердить стабильность посевного материала вируса.

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

Должна быть продемонстрирована чистота вакцинного вируса и клеток, использованных для производства вакцины. ИВВ не должен содержать посторонних микроорганизмов, бактерий или микоплазм, и это должно быть подтверждено с использованием методов с известной чувствительностью для выявления этих микроорганизмов. Исследуемые аликвоты должны быть репрезентативными для титра, достаточного для производства вакцины, но не такими высокими, чтобы гипериммунная антисыворотка не могла нейтрализовать вакцинный вирус в испытании на чистоту. Вакцинный вирус нейтрализуется моноспецифической антисывороткой или моноклональными антителами против ВГА-С, и смесь вирус/антитело культивируется на нескольких типах монослоев клеточных линий. Делаются субпассажи культур с 7-дневными интервалами в течение в общей сложности не менее 14 дней, затем проводятся испытания на предмет цитопатогенных и гемадсорбирующих микроорганизмов.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Описание процедуры производства

Если продемонстрирована эффективность вакцины и предлагаемые условия производства считаются приемлемыми регуляторными органами, производство вакцины может быть одобрено. ВГА-С можно выращивать в куриных эмбрионах или в культуре клеток. Выбор способа культивирования зависит от степени адаптации вируса, роста на среде, скорости мутации и продуктивности вируса в специальной системе культивирования. Количество пассажей ИВВ для вакцин против ВГА-С должно быть ограничено пятью для избегания генетических/антигенных изменений. Обычно крупномасштабные системы культивирования монослоев или суспензий клеток функционируют в условиях строго контролируемых температуры, асептических условий и установленных методов производства для обеспечения единообразия серий. Когда вирус достигает максимального титра, определяемого на основе ГА, ЦПД, реакции иммунной флюоресценции или другого одобренного метода, вирус очищают, фильтруют и инактивируют. Успешно используется несколько веществ для инактивации, включая формалин или бинарный этиленимин. Обычно добавляют адъювант для усиления иммунной реакции.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Клетки изучают на предмет посторонних вирусов, которые могли инфицировать клетки или посевной материал при предшествующих пассажах. Возможные контаминанты включают вирус вирусной диареи крупного рогатого скота, реовирус, вирус бешенства, вирус болезни Ауески (ложное бешенство), вирус инфекционного гастроэнтерита, респираторный коронавирус свиней, парвовирус свиней, аденовирус свиней, вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита, ротавирус свиней, цирковирус свиней и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Клеточные линии, на которых исследуется вакцинный вирус, включают: клеточную линию почек африканской зеленой

мартышки (Vero) (бешенство и реовирусы), клеточную линию свиней, клеточную линию из клеток, используемых для размножения вакцинного вируса, если она не происходит от свиней, и клеточные линии других видов животных, на которых проводятся пассажи вакцинного вируса. Кроме того, рекомендуется клеточная линия, высоко пермиссивная для вируса вирусной диареи крупного рогатого скота типов 1 и 2. Вирус вирусной диареи крупного рогатого скота является потенциальным контаминантом, внедряющимся в результате использования сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота в системах культивирования клеток.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

Клеточные культуры следует исследовать макроскопически на предмет отклонений или признаков контаминации и отбраковывать в случае неудовлетворительных результатов. Партия вируса готова, когда ЦПД достигает 80 - 90%. Концентрацию вируса можно оценить с использованием антигенной массы или анализа инфекционности.

2.2.4. Испытания партии готового препарата

Для штаммов-кандидатов для использования в вакцине должны быть продемонстрированы чистота, безопасность, активность и эффективность.

i) Стерильность и чистота

В ходе производства партии как инактивированного, так и живого вакцинного вируса должны быть испытаны на контаминацию бактериями, микоплазмами и грибами, и результаты затем подтверждают путем анализа готового продукта (см. главу 1.1.9. *Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации*).

ii) Безопасность

Должно быть проведено исследование кинетики инактивации с использованием утвержденного вещества для инактивации для титра вируса, большего, чем максимальный производственный титр, и выращенного с использованием утвержденного производственного метода. Это исследование должно продемонстрировать, что метод инактивации достаточный для обеспечения полной инактивации вируса. В ходе инактивации с регулярными интервалами забирают образцы, которые затем высевают в восприимчивые клеточные линии или в аллантоисную полость куриных эмбрионов, при этом должна наблюдаться линейная и полная потеря титра к концу процесса инактивации. После инактивации он должен составлять менее одной инфекционной частицы на 10^4 л жидкости.

iii) Активность партии

В ходе производства определяют содержание антигена для подтверждения того, что достигнут минимальный общий титр. Содержание антигена обычно определяют до инактивации и перед дальнейшей обработкой. Методы, позволяющие определить содержание антигена в конечном продукте, включают твердофазный ИФА для определения относительной активности, ГА и РТГА. Необходимо подтвердить чувствительность, специфичность, воспроизводимость и надежность этих методов.

Анализ активности, проводимый во время изучения минимальной защиты антигена, должен использоваться для оценки новых серий при выпуске. Анализ должен быть специфичным и воспроизводимым. Он должен позволять надежно выявлять вакцины, которые имеют недостаточную активность. Если в серологических исследованиях используются не свиньи, а лабораторные животные, сначала необходимо продемонстрировать, что вакцинация лабораторных животных приводит к специфичной, чувствительной, дозозависимой реакции, определяемой при анализе активности и коррелирующей с защитой у свиней.

2.3. Требования к регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

i) Безопасность у целевых и нецелевых животных

Образцы готового продукта инактивированной вакцины в конечной упаковке должны испытываться на безопасность у молодых мышей. В целом, здоровые поросята в возрасте отъема или более старшем и супоросные свиноматки на любом сроке гестации могут быть безопасно вакцинированы инактивированными вакцинами против ВГА-С. Конечный продукт может быть оценен на животных-хозяевах минимального возраста, в котором рекомендовано использование, согласно инструкции по применению препарата; за животными наблюдают в течение 21 дня. Рекомендуются также полевые исследования безопасности, проведенные на вакцинированных животных, по крайней мере в трех разных географических регионах, при не менее чем 300 животных в каждой регионе.

ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин

Возврат к вирулентности для живых вирусных вакцин часто демонстрируют путем обратных пассажей у восприимчивых видов животных. Вирус выделяют от вакцинированных животных, затем выделенный вирус используют для инокуляции других животных. Последовательные пассажи у животных должны показать, что животные остаются клинически здоровыми и не имеют типичных признаков ВГА-С.

iii) Экологические соображения

Инактивированные вакцины против ВГА-С не несут особого риска для пользователя, хотя случайное введение себе может привести к нежелательной реакции, вызванной адъювантом и вторичными компонентами вакцины. Атенуированные живые вакцины могут представлять опасность для пользователя в зависимости от уровня инактивации вируса и восприимчивости человека в отношении адаптированного к свиньям вируса.

Консервантов следует по возможности избегать, а когда это невозможно, следует ограничиться наименьшей возможной концентрацией. Наиболее часто используемым консервантом является тимеросол, в итоговой концентрации не более 0,01% (1/10 000). В вакцинах против ВГА-С можно в качестве консервантов использовать антибиотики, но есть ограничения по типу и концентрации. Ограничения также касаются остаточных антибиотиков из сред для культуры клеток, которые могут присутствовать в конечном продукте. Например, общее количество консервантов и остаточного гентамицина не должно превышать 30 мкг на 1 мл вакцины.

Флаконы с вакциной, шприцы и иглы могут представлять собой опасность для окружающей среды в случае вакцин с адъювантами или консервантами и для аттенуированных живых вакцин. Указания по утилизации должны быть приведены на упаковке вакцины и основаны на текущих экологических нормативах в стране использования.

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

Степень защиты, обеспечиваемая вакциной, определяется в исследовании с вакцинацией/заражением, проводимом у свиней с использованием гомологичных и геетрологичных штаммов для заражения. Свиньи, используемые в исследовании вакцинации/заражения, не должны иметь антител против ВГА-С в начале эксперимента. Исследования вакцинации/заражения должны проводиться с использованием вируса, полученного с помощью предлагаемого метода производства при максимальном допустимом уровне пассажа и с использованием свиней минимального рекомендованного возраста, указанного в информации к

препарату. Сначала получают партии, содержащие разные количества вирусного антигена. Исследуемая серия, содержащая наименьшее количество антигена, продемонстрировавшее защиту, становится стандартом, относительно которого изучаются производственные серии в будущем. Самым важным критерием для оценки групп лечения в слепых исследованиях является статистически значимое снижение вирусной нагрузки (титра и продолжительности выделения вируса) в дыхательных путях вакцинированных свиней. Различия в области клинических данных и поражений легких также находятся среди критериев, используемых для определения успешности испытания. Если для определения активности каждой производственной партии вакцины должны использоваться методы *in vivo* или *in vitro,* такие исследования должны проводиться одновременно с изучением минимального количества антигена для определения критериев для выпуска. В некоторых странах имеются комбинированные вакцины, содержащие более одного штамма ВГА-С. Эффективность разных компонентов этих вакцин должна быть установлена независимо, а затем в виде комбинации в случае взаимодействия между разными антигенами.

Продолжительность иммунитета и рекомендованная частота вакцинации для вакцины должны определяться до регистрации продукта. Сначала такую информацию получают непосредственно с использованием исследований по вакцинации/заражению животных-хозяев. Период, в течение которого продемонстрирована защита, определенная по способности вакцины предотвращать заражение в действительном испытании, может быть включен в информацию о препарате. После проведения соответствующего анализа активности, если дрейф антигенов требует замены штаммов в пределах вакцины, штаммы того же подтипа могут быть оценены как у животного-хозяина, так и у модельного лабораторного животного, для которого установлена корреляция. Другие значимые факторы включают адъювант и дозу антигена. Соответственно, по-видимому, эффективность вакцины должна всегда оцениваться у свиней.

Если вакцина должна использоваться у свиней, предназначенных для рынка для потребления человеком, срок ожидания, соответствующий использованному адъюванту (обычно 21 день), должен быть установлен на основе таких методов, как гистопатологическое исследование, результаты которого должны быть представлены в соответствующие регуляторные органы по безопасности продуктов питания.

ii) Для борьбы и искоренения заболевания

Здесь действуют те же принципы, что и для использования животноводческой продукции. Кроме того, следует отметить, что реакция антител у вакцинированных животных может не отличаться от таковой у животных, заразившихся вирусом в поле. Поэтому вакцинированные животные должны быть точно выявлены, если серологические методы будут использоваться вместе с соответствующими клиническими признаками для оценки экспозиции вируса с поле.

2.3.3. Стабильность

Вакцины должны храниться при минимальной экспозиции на свету при температуре 4°C ± 2°C, или как указано соответствующими регуляторными органами. Срок годности должен быть определен путем проведения утвержденного испытания на активность в течение предлагаемого срока годности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

BARBÉ F., LABARQUE G., PENSAERT M. & VAN REETH K. (2009). Performance of a commercial swine influenza virus H1N1 and H3N2 antibody enzyme-linked immunosorbent assay in pigs experimentally infected with European influenza viruses. *J. Vet. Diagn. Invest*., **21**, 88–96.

BROOKES S.M., NÚÑEZ A., CHOUDHURY B., MATROSOVICH M., ESSEN S.C., CLIFFORD D., SLOMKA M.J., KUNTZ-SIMON G., GARCON F., NASH B., HANNA A., HEEGAARD P.M., QUÉGUINER S., CHIAPPONI C., BUBLOT M., GARCIA J.M., GARDNER R., FONI E., LOEFFEN W., LARSEN L., VAN REETH K., BANKS J., IRVINE R.M. & BROWN I.H. (2010). Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. *PLoS One*. Feb 5; **5** (2): e9068. doi:10.1371/journal.pone.0009068

BROWN I.H. (2013). History and epidemiology of swine influenza in Europe. *Curr. Topics Microbiol. Immunol*., **370**,133–146.

CHIAPPONI C., MORENO A., BARBIERI I., MERENDA M. & FONI E. (2012) Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2. *J. Virol. Methods*, **184**, 117–120.

CIACCI-ZANELLA J.R., VINCENT A.L., PRICKETT J.R., ZIMMERMAN S.M. & ZIMMERMAN J.J. (2010). Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. *J. Vet. Diagn. Invest*., **22**, 3–9.

KARASIN A.I., LANDGRAF J., SWENSON S., ERICKSON G., GOYAL S., WOODRUFF M., SCHERBA G., ANDERSON G. & OLSEN C.W. (2002). Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J. Clin. Microbiol*., **40**, 1073–1079.

KARASIN A.I., SCHUTTEN M.M., COOPER L.A., SMITH C.B., SUBBARAO K., ANDERSON G.A., CARMAN S. & OLSEN C.W. (2000). Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res*., **68**, 71–85.

LINDSTROM S., GARTEN R., BALISH A., SHU B., EMERY S., BERMAN L., BARNES N., SLEEMAN K., GUBAREVA L., VILLANUEVA J. & KLIMOV A. (2012). Human infections with novel reassortant influenza A(H2N2)v viruses, United States, 2011. *Emerg. Infect. Dis*., **18**, 834–837.

MYERS K.P., OLSEN C.W., & GRAY G.C. (2007). Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin. Infect. Dis*, **44**, 1084–1088.

NAGARAJAN M.M., SIMARD G., LONGTIN D. & SIMARD C. (2010). Single-step multiplex conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for simultaneous detection and subtype differentiation of Influenza A virus in swine. *J. Vet. Diagn. Invest*., **22**, 402–408.

OLSEN C.W. (2002). Emergence of novel strains of swine influenza virus in North America, *In:* Trends in Emerging Viral Infections of Swine, Morilla A., Yoon K.J. & Zimmerman J.J., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 37–43.

SENNE D.A. (1998). Virus propagation in embryonating eggs. *In:* A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 235–240.

SLOMKA M.J., DENSHAM A.L., COWARD V.J., ESSEN S., BROOKES S.M., IRVINE R.M., SPACKMAN E., RIDGEON J., GARDNER R., HANNA A., SUAREZ D.L. & BROWN I.H. (2010). Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs. *Influenza Other Respir. Viruses*, **4**, 277–293.

SPACKMAN E., SENNE D.A., MYERS T.J., BULAGA L.L., GARBER L.P., PERDUE M.L., LOHMAN K., DAUM L.T. & SUAREZ D.L. (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3256–3260.

SWENSON S.L., VINCENT L.L, LUTE B.M., JANKE B.H., LECHTENBERG K.E., LANDGRAF J.G., SCHMITT B.J., KINKER D.R. & MCMILLEN J.K. (2001). A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 36–42.

VINCENT L.L., JANKE B.H., PAUL P.S. & HALBUR P.G. (1997). A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 191–195.

VINCENT A.L., MA W., LAGER K.M., GRAMER M.R., RICHT J.A. & JANKE B.H.(2009). Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes*, **39** (2), 176–185. doi: 10.1007/s11262-009-0386-6

WEBBY R.J., ROSSOW K., ERICKSON G., SIMS Y. É WEBSTER R. (2004). Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res*., **103**, 67–73.

ZHOU N.N., SENNE D.A., LANDGRAF J.S., SWENSON S.L., ERICKSON G., ROSSOW K., LIU L., YOON K.J., KRAUSS S. & WEBSTER R.G. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J. Virol*., **73**, 8851–8856.

***

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по диагностике гриппа 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 гриппа свиней, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.