Изображение государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТРАНСМИССИВНОГО   
ГАСТРОЭНТЕРИТА СВИНЕЙ**

**Основные положения**

**СТ РК**

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения*

**Комитет технического регулирования и метрологии**

**Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан**

**(Госстандарт)**

**Астана**

**Предисловие**

**1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического   
регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета   
технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от \_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ г. № \_\_\_\_

**3** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан «О ветеринарии» от 10 июля 2002 года N 339

**4** **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Документы по стандартизации», а текст изменений и поправок – в периодически издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном каталоге «Национальные стандарты».*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Содержание**

[1 Область применения 1](#_Toc138241848)

[2 Нормативные ссылки 1](#_Toc138241849)

[3 Обозначения и сокращения 1](#_Toc138241850)

[4 Методы диагностики 1](#_Toc138241851)

[5 Идентификация возбудителя 2](#_Toc138241852)

[5.1 Выделение вируса на тканевой культуре 2](#_Toc138241853)

[5.2 Тест на флуоресцентные антитела к вирусным антигенам 3](#_Toc138241854)

[5.3. Обнаружение антигенов вируса в фекалиях твердофазным иммуноферментным анализом 4](#_Toc138241855)

[5.4 Методы распознавания нуклеиновой кислоты 4](#_Toc138241856)

[6 Серологические тесты 5](#_Toc138241857)

[6.1 Общие положения 5](#_Toc138241858)

[6.2 Тесты для определения вируса трансмиссивного гастроэнтерита/респираторного коронавируса свиней 5](#_Toc138241859)

[6.2 Тесты, специфичные для вируса трансмиссивного гастроэнтерита и позволяющие дифференцировать свиней, инфицированных ВТГ, от свиней, инфицированных РКС 7](#_Toc138241860)

[7 Требования к вакцинам 8](#_Toc138241861)

[7.1 Контроль посевного вируса 8](#_Toc138241862)

[7.2 Способ изготовления 8](#_Toc138241863)

[7.3 Внутрипроизводственный контроль 8](#_Toc138241864)

[7.4 Контроль партии 9](#_Toc138241865)

[7.3 Испытания готового лекарственного препарата 10](#_Toc138241866)

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА** **ТРАНСМИССИВНОГО   
ГАСТРОЭНТЕРИТА СВИНЕЙ**

**Основные положения**

**Дата введения**

# **1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной   
диагностики трансмиссивного гастроэнтерита свиней.

# **2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте нормативные ссылки отсутствуют.

# **3 Обозначения и сокращения**

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения

+++ - рекомендуется;

++ - рекомендуется, но имеет ограничения;

+ - подходит в очень ограниченных случаях;

– - не соответствует;

AGID - иммунодиффузия в агаровом геле;

ОТ-ПЦР- полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой;

C-ИФА - конкурентный иммуноферментный анализ;

VN - нейтрализация вируса.

# **4 Методы диагностики**

Вирус может быть идентифицирован путем выделения его на тканевой культуре (Dulac et al., 1977), иммунофлюоресцентными методами, реакцией обратной пассивной гемагглютинации, твердофазными иммуноферментными анализами (твердофазными ИФА), радиоиммунным анализом (РА), гибридизацией с ДНК- зондами, электронной микроскопией и по специфической вирусной РНК (Enjuanes & Van der Zeijst, 1995; Kim et al., 2000a; Paton et al., 1997; Saif & Sestak, 2006; Sirinarumitr et al., 1996; Woods, 1997). Такие молекулярные методы, как ПЦР ОТ и гнездовая ПЦР ОТ, разработанные в последние несколько лет, повысили чувствительность и специфичность обнаружения и дифференциации ВТГ и РКС непосредственно в полевых образцах (Costantini et al., 2004; Kim et al., 2000a; 2000b; Paton et al., 1997). Альтернативным диагностическим методом, который был рекомендован для лабораторий с дефицитом площадок для специализированных тестов, является пероральное введение восприимчивым, сероотрицательным по ВТГ/РКС поросятам подозреваемого содержимого кишечника. Однако лабораторные тесты попрежнему требуют подтверждения восприимчивости свиней перед заражением, а также подтверждения того, что любое заболевание, вызванное у этих животных, является ТГ. Наиболее распространенными в практике оперативными исследованиями, вероятно, являются иммунодиагностические: в частности, твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) фекалий (Bernard et al., 1986; Lanza et al., 1995; Van Nieuwstadt et al., 1988b), реакция иммунной флюоресценции (РИФ) криостатических срезов кишечника (Pensaert et al., 1968), а также иммуногистохимический анализ (ИА) фиксированных в формалине парафиновых срезов (Shoup et al., 1996). Было описано также обнаружение вируса реакцией обратной пассивной гемагглютинации (Asagi et al., 1986). Другое кишечное заболевание, эпидемическая диарея свиней (ЭДС), вызывается серологически отличным коронавирусом, который, однако, обладает идентичными внешними признаками под электронным микроскопом. С диагностической точки зрения, иммуноэлектронная микроскопия позволяет избежать такой проблемы (Saif et al., 1977; Van Nieuwstadt et al., 1988a), как и применение методов обнаружения, вирусспецифичных для ЭДС (Kim et al., 2001).

# **5 Идентификация возбудителя**

## **5.1 Выделение вируса на тканевой культуре**

Помимо инокуляции живых поросят (Dulac et al., 1977), это наиболее точный метод диагностики. Однако он долог и трудозатратен для рутинного применения. ВТГ плохо растет в клеточной культуре, что делает указанный метод непригодным для рутинной диагностической практики. Кроме того, выделение ВТГ от свиней в сероположительных по РКС стадах, также сопряжено с проблемами и нередко требует помещения сероотрицательных по ВТГ/РКС свиней, которые служат индикатором, в подозреваемое стадо с последующим сбором образцов от свиней-индикаторов для выделения или обнаружения ВТГ (Costantini et al., 2004; Kim et al., 2000b). РКС можно выделить на тканевой культуре, применяя типы клеток и методики, аналогичные таковым для ВТГ, и клетки или жидкости носовой полости, а также ткани или гомогенаты трахеи, миндалин или легких в качестве оптимальных образцов (Costantini et al., 2004; Pensaert et al., 1986).

Попытки выделить ВТГ обычно предпринимаются до смертельного исхода (из фекалий) или посмертно (из тонкого кишечника). Наиболее предпочтительны в качестве образцов петли пораженного тонкого кишечника, лигированные с двух концов, чтобы сохранить содержимое, или мазки-отпечатки слизистой оболочки просветной поверхности тонкого кишечника. Поскольку вирус термолабилен, все образцы должны быть свежими или охлажденными.

Исследуемый материал гомогенизируют в питательной среде клеточной культуры или фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) со значением pH 7,2, содержащем антибиотики, например, пенициллин (1000 ед./мл), дигидрострептомицин (1000 ед./мл) и микостатин (20 ед./мл), с получением 10% суспензии. Полученную суспензию оставляют на 30 минут в местах, защищенных от воздействия прямых солнечных лучей, при комнатной температуре. Затем ее подвергают ультразвуковой обработке и осветляют низкоскоростным центрифугированием. Надосадочную жидкость можно смешать с равным объемом сыворотки крови крупного рогатого скота, инактивированной нагреванием, такая обработка позволяет снизить цитотоксический эффект материала и после этого ее используют для инокуляции восприимчивых клеточных культур, например, первичных или вторичных монослоев клеток почек поросят 3–4-дневного возраста. Для первичного выделения вируса, можно также использоваться другие культуры клеток низкого пассажа свиного происхождения (такие, как клетки щитовидной железы и семенника) и некоторые клеточные линии (Honda et al., 1990; McClurkin & Norman, 1966). После инкубации при температуре 37°C в течение 1 часа, клеточные пласты покрывают такой питательной средой, как сбалансированный солевой раствор Эрла с дрожжевой вытяжкой и гидролизатом лактальбумина (EYL), содержащий натрия бикарбонат и антибиотики, например, пенициллин (100 ед./мл), дигидрострептомицин (100 мкг/мл) и микостатин (20 ед./мл), и 1% фетальной телячьей сыворотки крови. Включение трипсина в питательную среду культуры может улучшить первичное извлечение вируса (Bohl, 1979; Honda et al., 1990). Параллельно готовят контрольные культуры без инокуляции, и все культуры инкубируют при температуре 37°C.

Вирусное цитопатическое действие (ЦД) может наблюдаться через 3–7 дней, характеризующийся округлением клеток, их увеличением, образованием синцития и выделением в среду. Образование бляшек в некоторых случаях служит более надежным и легким способом распознавания. Покрытие, наиболее подходящее для выявления бляшек – 2- кратная минимальная поддерживающая среда с 1,6% очищенного агара, 1% NaCO3, антибиотиками (указаны выше), 0,7% нейтрального красного и 1% ДЭАЭ (диэтиламиноэтила; 100 мкг/мл). Дикий тип ВТГ плохо растет на тканевой культуре, поэтому для того, чтобы эти характерные изменения стали четкими, может понадобиться несколько субпассажей. Принадлежность цитопатических изолятов к ВТГ подлежит подтверждению иммуноокрашиванием или реакцией нейтрализации in vitro с использованием соответствующей, специфичной к ВТГ, антисыворотки (Bohl, 1979). При наличии подходящих моноклональных антител (МА) их можно использовать для дифференциации ВТГ и РКС методами иммуноокрашивания (Garwes et al., 1988; Simkins et al., 1992). Дифференциация ВТГ и РКС может также быть дополнена специфичными для ВТГ кДНК-зондами (Bae et al., 1991), или избирательной ПЦР ОТ, или гнездовой ПЦР ОТ (Costantini et al., 2004; Kim et al., 2000a; 2000b; Paton et al., 1997).

## **5.2 Тест на флуоресцентные антитела к вирусным антигенам**

Реакция иммунной флюоресценции – быстрый, чувствительный и специфичный способ идентификации антигенов вируса ТГ в криостатических срезах кишечника. Требуются свежие трупы свиней; кроме того, оптимально, если возраст животного составляет менее 4 недель (предпочтительно менее 1 недели), а клинические признаки заболевания только манифестировали (другими словами, не позднее 24–28 часов от заражения). В пределах 30 минут от наступления смерти, из четырех разных участков задней части тонкого кишечника берут фрагменты длиной по 2 см. От них отрезают фрагменты длиной по 5–10 мм для мгновенного замораживания твердым СО2. Правильное направление материала важно для того, чтобы обеспечить впоследствии при нарезке микротомом-криостатом получение истинных поперечных срезов. Срезы толщиной 6 мкм помещают на предметные стекла, сушат на воздухе и фиксируют ацетоном. Альтернативная и более оперативная процедура предполагает отбор и продольное вскрытие участка дистальной части тонкого кишечника, осторожную промывку слизистой поверхности ФСБР и подготовку мазков-отпечатков просветной поверхности кишечника на очищенных этанолом предметных стеклах с последующей сушкой воздухом и фиксацией ацетоном (Bohl, 1979). Предметные стекла затем обрабатывают и окрашивают, как криостатические срезы из представленного ниже описания. Зафиксированные положительные и отрицательные контрольные срезы или мазки хранят при температуре -20°C для параллельного окрашивания. После промывки трис-буфером со значением pH 8,7 или ФСБР, срезы окрашивают разбавленным раствором антитела к ВТГ, конъюгированного с флюоресцина изотионатом (ФИ), и помещают во влажный термостат при температуре 37°C на 30 минут. Любой несвязанный краситель удаляется промывкой трис-буфером. По желанию, срезы докрашиваются разведением 10-5 синего Эванса в трис-буфере и помещаются в глицерин.

Окрашенные срезы или мазки исследуются микроскопией в ультрафиолетовом свете, как можно быстрее. Качество окрашивания определяют по сравнению с контролями. Точная интерпретация зависит от сохранности архитектуры ворсин, эпителиальные клетки которых исследуются на наличие внутрицитоплазматической флуоресценции.

Пероксидазно-антипероксидазный иммуногистохимический метод для обнаружения ВТГ был разработан для того, чтобы обнаруживать ВТГ и РКС как в замороженных, так и фиксированных в формалине, залитых в парафин тканях (Jean et al., 1987; Shoup et al., 1996). Применение иммуногистохимического анализа в случае фиксированных в формалине тканей предпочтительнее, поскольку он может выполняться как проспективно, так и ретроспективно по одним и тем же фиксированным в формалине тканям, которые используются для патогистологического исследования, и фиксированные ткани или препараты легче транспортировать, так как они стабильны и не содержат живой вирус (Shoup et al., 1996).

## **5.3. Обнаружение антигенов вируса в фекалиях твердофазным иммуноферментным анализом**

Может использоваться система типа «сандвич» на основе двух антител: например, с захватывающим моноклональным антителом и поликлональным, связанным с ферментом детекторным антителом (Lanza et al., 1995; Sestak et al., 1996). Этот анализ базируется на захвате вирусного антигена из образца фекалий тремя моноклональными антителами, двумя специфичными к белку S (сайт A и D) и одним специфичным к нуклеопротеину N (Lanza et al., 1995; Sestak et al., 1996). Отрицательное покрытие используется в качестве контроля специфичности анализа; оно состоит из антител, выделенных из асцитической жидкости мышей, после введения им клеток миеломы SP2/0, которые не распознаются ВТГ. Моноклональные антитела наносятся на 96- луночные микропланшеты в бикарбонатном буферном растворе со значением pH 9,6 и инкубируются в течение ночи при температуре 37°C. Для анализа всех образцов предусмотрены две лунки: в одной содержится положительное покрытие (моноклональные антитела к ВТГ), а в другой – отрицательное. Образцы фекалий разбавляют питательной средой клеточной культуры (1/10), перемешивают на вихревой мешалке и центрифугируют на низкой скорости (2000 g) в течение 15 минут. Затем надосадочную жидкость сливают в стерильные пробирки и подвергают анализу или направляют на хранение в замороженном состоянии. Перед добавлением подготовленных образцов фекалий, планшеты дважды промывают промывочным буферным раствором (ФСБР, содержащий 0,05% полисорбата 20). Планшеты инкубируют в течение ночи при температуре 37°C. После четырехкратной промывки, сыворотку крови с биотинилированными поликлональными антителами к ВТГ добавляют в ФСБР, содержащий 0,05% полисорбата 20. Планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа. Планшеты промывают четыре раза перед добавлением конъюгата (стрептавидин, меченный пероксидазой хрена) и инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа. Планшеты промывают шесть раз перед добавлением субстрата фермента, ABTS (2,2'-азиноди-[3-этил-бензотиазолин]-6- сульфоновой кислоты), с 0,03% H2O2 в 0,1 М цитратном буферном растворе со значением pH 4,2. Реакцию останавливают через 30 минут, при комнатной температуре добавлением 5% раствора натрия додецилсульфата и определяют оптическую плотность в считывающем устройстве для твердофазного ИФА при 405 нм. Отрицательные и положительные по ВТГ образцы фекалий вносят на каждый планшет.

## **5.4 Методы распознавания нуклеиновой кислоты**

Были описаны методы in situ гибридизации (IHS) и ПЦР ОТ для прямого обнаружения ВТГ в клинических образцах, с дифференциацией от РКС (Kim et al., 2000a; Paton et al., 1997; Sirinarumitr et al., 1996). Второй раунд гнездовой ПЦР может значительно улучшить чувствительность (Costantini et al., 2004; Kim et al., 2000a; 2000b; Paton et al., 1998). Дифференциация вирусов ТГ может быть проведена путем определения продуктов ПЦР, полученных с помощью ферментов рестрикционных эндонуклеаз (Woods, 1997), или секвенированием (Costantini et al., 2004; Kim et al., 2000b; McGoldrick et al., 1999; Paton & Lowings, 1997; Zhang et al., 2007). Была описана дуплексная ПЦР ОТ для совместного выявления ВТГ и вируса эпидемической диареи свиней (Kim et al., 2001).

# **6 Серологические тесты**

## **6.1 Общие положения**

Серологические реакции могут иметь диагностическое значение в том случае, если они способны выявить рост титров антител. Кроме того, диагностическую значимость приобретает единичный сероположительный результат, если он получен в популяции, ранее считавшейся сероотрицательной. Поскольку вероятность приобретения свиньями статуса носителя вируса удается снизить путем принятия только сероотрицательных животных, серологические исследования также обычно являются непременным условием импорта.

Антитела к вирусу можно обнаружить в сыворотке крови через 6–7 дней после инфицирования ВТГ или РКС, и эти антитела сохраняются как минимум многие месяцы. Хотя антитела к РКС и ВТГ обеспечивают полную нейтрализацию каждого из вирусов, существуют различия в специфичности некоторых антител, не осуществляющих нейтрализацию (не нейтрализующие антитела; Callebaut et al., 1988; Enjuanes & Van der Zeijst, 1995; Garwes et al., 1988; Saif & Sestak, 2006; Simkins et al., 1992), поскольку у РКС отсутствуют определенные эпитопы, имеющиеся у ВГТГ. Несмотря на это, реакция вирусной нейтрализации (НВ) не является практическим методом дифференциации инфекции, вызванной РКС и ВТГ. В конкурентный, твердофазный ИФА можно включить моноклональные антитела к этим участкам, чтобы обнаруживать в сыворотке крови антитела, специфичные исключительно к ВТГ. При том, что такие методы надежны в части того, что они не дают ложноположительных результатов с антисывороткой к РКС, возможно получение ложноотрицательных результатов из-за более низкой чувствительности в сравнении с реакцией нейтрализации, а также из-за межштаммовой вариабельности вируса ТГ: определенные моноклональные антитела к ВТГ могут оказаться неспособными распознавать все штаммы (Brown & Paton, 1991; Simkins et al., 1992). Проблема нечувствительности может быть снижена посредством использования тестов на групповом или стадном уровне. При оценке животных, предназначенных на экспорт, такие твердофазные ИФА на основе моноклональных антител являются методом выбора для дифференциации РКС и ВТГ.

Стоит отметить, что использование таких тестов для дифференциальной диагностики менее чем через 3 недели после воздействия РКС дает нестабильные и ненадежные результаты (Sestak et al., 1999b). Более точные результаты были также получены при исследовании парных образцов сыворотки крови (взяты в острый период и период выздоровления) и при использовании рекомбинантного белка spike (S) ВТГ, в качестве покрывающего антигена вместо инфицированных иммобилизованных клеток семенника хряка (Sestak et al., 1999b).

## **6.2 Тесты для определения вируса трансмиссивного гастроэнтерита/респираторного коронавируса свиней**

Эти тесты позволяют обнаруживать антитела как к ВТГ, так и к РКС, и включают в себя реакцию НВ, непрямой твердофазный ИФА (Hohdatsu et al., 1987; Huang et al., 1988; Liu et al., 2001; McGoldrick et al., 1999; Rukhadze et al., 1989) и конкурентный твердофазный ИФА на основе группоспецифичных моноклональных антител к ВТГ и РКС (Paton et al., 1991).

Реакция НВ может выполняться с использованием разных типов клеток и вирусных штаммов. Обычно используют такие клеточные линии, как клетки семенников хряка (McClurkin & Norman, 1966) или первичные или перевиваемые клетки почек свиньи. Указанные тесты очень широко применяются многие годы и общепризнаны стандартными: оценка новых методов выполняется в сравнении с ними. Обычно используется анализ НВ с использованием монослоев клеток семенников свиней в шестилуночных пластиковых планшетах и аттенуированного штамма Purdue ВТГ (Bohl, 1979). В модифицированном методе Витте (Witte, 1971), описанном ниже, используются плоскодонные микротитрационные планшеты для тканевой культуры, линия клеток A72, выделенных из опухоли прямой кишки собаки, и полевой штамм вируса, адаптированный для роста в таких клетках: вирус в количестве 100 ТЦД50 (тканевая цитопатическая доза, при которой погибает 50% культуры) инкубируют с инактивированной нагреванием испытуемой сывороткой крови; нейтрализацию определяют по отсутствую ЦД после дальнейшей инкубации с клетками A72 в питательной среде Лейбовица 15 («Сигма», Великобритания), в которую добавлены антибиотики, 10% фетальной телячьей сыворотки крови и 1% L-глутамина. Общий объем реактивов во всех лунках составляет 150 мкл.

Нейтрализация вируса: процедура тестирования:

i) Инактивируют сыворотку крови в течение 30 минут на водяной бане при температуре 56°C.

ii) Выполняют двукратное разведение испытуемой сыворотки крови в питательной среде клеточной культуры, начиная с неразбавленной сыворотки крови (это дает разведение 1/2 на стадии нейтрализации после смешивания с равным объемом раствора вируса). Разведения готовят на 96-луночном плоскодонном микротитрационном планшете для культуры клеток, используя в оптимальном варианте по три лунки на разведение с объемом содержимого каждой лунки 25 мкл. Положительную и отрицательную контрольную сыворотку крови также включают в тест. Стандартная сыворотка отсутствует, но готовят внутренние положительные стандартные образцы с титрованием в соответствующем диапазоне.

iii) 25 мкл исходного раствора ВТГ добавляют в каждую лунку в таком разведении в питательной среде культуры, которое, исходя из расчетов, обеспечит 100 ТЦД50 в одной лунке. Вирус добавляют в две из трех лунок, содержащих сыворотку крови в каждом разведении. Третья лунка служит контролем исключительно из сыворотки крови: в нее вносят 25 мкл питательной среды культуры вместо вируса.

iv) Выполняют обратное титрование остаточного вируса в четырех этапах с шагом 10, используя по 25 мкл на лунку и не менее четырех лунок на разведение; 25 мкл питательной среды культуры добавляют во все лунки обратного титрования, чтобы компенсировать отсутствие испытуемой сыворотки.

v) Планшеты быстро встряхивают, а затем инкубируют в течение 1 часа в атмосфере с содержанием 5% CO2 при температуре 37°C.

vi) 100 мкл, например, суспензии клеток А72 в концентрации 2 х 105 клеток в одном мл добавляют в каждую лунку.

vii) Планшеты инкубируют в течение 3–7 дней в атмосфере с содержанием 5% CO2 при температуре 37°C; тест может быть успешно проведен, если планшеты инкубируют без CO2.

viii) Чтобы определить ЦД, выполняют считывание планшетов под микроскопом. Для признания теста достоверным проверяют результаты обратного титрования раствора вируса (должно быть получено значение 100 ЦПД50 с допустимым диапазоном 50¬–200 ЦПД50) и контрольной сыворотки крови. Стандартная положительная сыворотка должна давать значение в пределах 0,3 log10 единиц в обе стороны от своего заранее определенного среднего значения. Считывание для каждого разведения испытуемой сыворотки крови выполняется по отношению к соответствующему контролю исключительно из сыворотки крови для дифференциации ЦД вируса от обусловленного сывороткой крови цитотоксического эффекта или контаминации.

ix) Результаты испытуемой сыворотки крови определяют по методу Спирмена-Кербера, как разведение сыворотки крови, которое нейтрализовало вирус в 50% лунок.

x) Отрицательная контрольная сыворотка крови не обеспечивает нейтрализации при самом низком испытуемом разведении (например, неразбавленная сыворотка крови, соответствующая разведению 1/2 на стадии нейтрализации).

## **6.3 Тесты, специфичные для вируса трансмиссивного гастроэнтерита и позволяющие дифференцировать свиней, инфицированных ВТГ, от свиней, инфицированных РКС**

Специфичные для ВТГ тесты – это блокирующий или конкурентный твердофазный ИФА, в котором используются моноклональные антитела, распознающие ВТГ, но не распознающие РКС (Brown & Paton, 1991; Callebaut et al., 1989; Sestak et al., 1999b; Simkins et al., 1992; Van Nieuwstadt & Boonstra, 1991); они являются тестами выбора при оценке животных, предназначенных на экспорт. Испытуемая сыворотка крови от свиней, ранее инфицированных штаммом ВТГ, который распознается моноклональными антителами, будет содержать антитела с эквивалентной специфичностью, способные конкурировать за связывание антигена ВТГ, иммобилизованного на планшетах для твердофазного ИФА. Свиньи, инфицированные РКС, у которого отсутствует уникальный эпитоп ВТГ, не вызовут образования антител к этому эпитопу; таким образом, антитела к РКС не будут конкурировать за связывание специфичных к ВТГ моноклональных антител или блокировать его (Brown & Paton, 1991; Callebaut et al., 1989; Sestak et al., 1999b; Simkins et al., 1992; Van Nieuwstadt & Boonstra, 1991). Антигены для твердофазного ИФА могут быть приготовлены из клеточных лизатов линий клеток почки, которые либо инокулированы штаммами ВТГ, адаптированными к клеточной культуре, либо не подверглись инфицированию. Также в качестве источника антигена использовались инфицированные или неинфицированные клетки семенников хряка, фиксированные в 80% растворе ацетона, либо антигены могли быть приготовлены из рекомбинантного белка S (rec-S), собранного в растворимой форме из клеточной линии насекомых (Sf9), инфицированной рекомбинантным бакуловирусом, экспрессирующим белок S ВТГ, содержащий четыре основных антигенных сайта (Sestak et al., 1999b; Simkins et al., 1992). Положительные и отрицательные антигены наносят через ряд на микротитрационные планшеты с использованием бикарбонатного буферного раствора со значением pH 9,6. Разбавленную испытуемую сыворотку крови, включая подтвержденный положительный контроль ВТГ и подтвержденный отрицательный контроль ВТГ/РКС, а также подтвержденный положительный контроль РКС (отрицательный в данном тесте, положительный в реакции НВ), добавляют в соответствующие лунки и инкубируют в течение ночи перед последующим добавлением во все лунки разбавленного раствора моноклональных антител. Связанные моноклональные антитела обнаруживают с помощью антитела к мышиным антителам, конъюгированного с пероксидазой, которое индуцирует цветовую реакцию в присутствии соответствующего субстрата. Изменение цветности измеряют с помощью спектрофотометра, и для каждого испытуемого образца окончательный результат – это разница в оптической плотности между лунками с положительным и отрицательным антигеном, выраженная в процентах результата, полученного от отрицательной контрольной сыворотки крови. Пороговое значение, разделяющее отрицательные и положительные результаты теста, должно быть определено в предшествующем исследовании подтвержденной отрицательной и подтвержденной положительной популяций. Существует ряд коммерческих наборов, специфичных для ВТГ.

Описанные к настоящему времени тесты на основе гемагглютинации (Labadie et al., 1977; Noda et al., 1987; Shimizu & Shimizu, 1977) были валидированы до появления РКС. Однако они могут быть специфичны для ВТГ, поскольку ВТГ (не РКС), обладает гемагглютинирующими свойствами (Schultze et al., 1996).

# **7 Требования к вакцинам**

## **7.1 Контроль посевного вируса**

7.1.1 Характеристики посевного вируса

Посевной вирус подлежит оценке на чистоту и подлинность. Испытание на чистоту предусматривает проверку свободы от бактерий и грибков (9 CFR 113:27), микоплазм (9 CFR 113:28) и посторонних вирусов (9 CFR 113:55; USDA, 1995 год). Подлинность обычно подтверждается в реакции НВ или реакции иммунной флюоресценции. От вакцин на основе вирусов, полученных методами генной инженерии, или вакцин на основе вирусов, полученных в результате естественного отбора, для которых заявлена делеция/инактивация гена, кодирующего антиген, требуется доказательство (генотипическое и/или фенотипическое) подлинности.

7.1.2. Способ культивирования

Культуру выращивают на клетках с подтвержденным отсутствием контаминации (одобренных), а количество пассажей клеточной культуры ограничено (обычно пятью). Вид, от которого происходит клеточная культура, не обязательно должен соответствовать целевому виду.

7.1.3 Валидация в качестве вакцины

Валидация в качестве вакцины проходит в двух формах. Производственный штамм считается иммуногенным, если для вакцины, изготовленной на самом высоком пассаже и в соответствии со схемой производства, доказаны защитные свойства. Самый низкий антигенный уровень (титр вируса в случае модифицированных вакцин или антигенная масса в случае инактивированных вакцины), для которого доказаны защитные свойства, становится исходным для всех будущих серий (партий) препарата. В случае живых вакцин, могут применяться поправочные коэффициенты на вариабельность титрования и на кривую зависимости гибели от времени. Эти экспериментальные вакцины подлежат оценке производителем на чистоту, безопасность и эффективность. Должна быть доказана защита от естественного заболевания, вызванного вирулентным контрольным вирусом. Вирулентный контрольный вирус определяется дозой, которая вызывает заболевание у ≥ 95% восприимчивых особей контрольной группы. Три серии, предшествующие выдаче лицензии, должны быть последовательно изготовлены и подвергнуты контролю на активность, стерильность и безопасность производителем и лицензирующим уполномоченным органом.

## **7.2 Способ изготовления**

Настоящая информация является собственностью каждого производителя и, следовательно, недоступна.

## **7.3 Внутрипроизводственный контроль**

На большую часть настоящей информации распространяется право собственности. Некоторые показатели внутрипроизводственного контроля относятся непосредственно к производству (например, концентрация O2 в биореакторе). Другая категория, в то же время включает в себя испытания, близкие к определению активности препарата в окончательной упаковке. В случае любой вакцины, чем легче испытание готовой серии или препарата в окончательной упаковке на активность, тем выше вероятность, что оно может использоваться для мониторинга/этапа перемешивания: например, результаты титрования вируса подсерий, могут использоваться для прогноза титра готовой серии после перемешивания. Ингредиенты животного происхождения подлежат стерилизации или подтверждению свободы от контаминантов.

## **7.4 Контроль партии**

7.4.1 Общие положения

Перемешивание партии должно обеспечивать соответствие спецификациям готового препарата и спецификациям фасовки (например, допускается объединение партий с этапа ферментации либо разделение одной партии и объединение ее с каждой из трех других и т. д.). В некоторых странах контроль нерасфасованного продукта и производственного процесса характеризуют препарат и являются предметом строгого регулирования и проверки. В США упор делается на готовый лекарственный препарат. Порядок контроля партии должен подробно описываться в схеме производства и быть обоснованным и отслеживаемым, а производитель обязан утилизировать продукт, который не соответствует спецификациям. В том случае, если партия предназначена для экспорта в другую страну, где будет происходить расфасовка или перемешивание, она подвергается тем же испытаниям, как если бы она была готовым лекарственным препаратом.

7.2.2 Стерильность

Все продукты должны быть протестированы на стерильность. Производитель также может проводить испытания партий на стерильность с целью мониторинга. Испытания аналогичны тем, что описываются в разделе С.1.1.

7.2.3 Безопасность

Испытания на безопасность выполняются перед выдачей лицензии, а затем для препарата в окончательной упаковке (разделы С.5.1 и С.5.2).

7.2.4 Активность

Активность в норме определяется только в случае простой методики этого испытания (например, твердофазный ИФА) с целью подтверждения расчетов для перемешивания перед расфасовкой.

7.2.5 Продолжительность иммунитета

Длительность иммунитета определяют в исследовании долицензионной серии (исследовании эффективности), не в ходе контроля партии. Новые препараты должны соответствовать заявленным в инструкции по применению лекарственного препарата схемам ревакцинации при проведении исследований эффективности (с заражением) в обозначенные временные точки после вакцинации.

7.2.6 Стабильность

Стабильность устанавливается до выдачи лицензии. Обычно для оценки срока годности применяют ускоренное состаривание (при температуре 37°C), чтобы не пришлось выдерживать препарат при температуре хранения (4°C) в режиме реального времени. Позже это будет подтверждено данными в реальном времени. Производитель не обязан проводить исследования стабильности. От производителей требуется заявить, какое количество антигенного материала будет содержаться в их препарате в течение срока годности. Отбор образцов препарата (обычно вручную) и их испытания выполняют не позднее 30 дней от даты истечения срока годности. Это позволяет обнаружить, например, что титр остается на уровне, заявленном в спецификации производителя. Влажность также влияет на стабильность. Влага, оставшаяся в высушенном продукте, может сократить срок его службы, поэтому это необходимо проверить на конечном продукте или в процессе производства.

7.2.7 Консерванты

Существуют ограничения по максимальному допустимому содержанию антибиотиков в препарате. Ограничения в отношении некоторых компонентов вакцины связаны с их безопасностью, а также с тем, достаточно ли долог установленный период каренции для выведения их из организма животного перед его убоем. На используемые консерванты распространяется право собственности.

7.2.8 Меры предосторожности (факторы риска)

Любые риски для вакцин должны быть четко указаны на этикетке. Это обычно касается предупреждения для беременных животных в случае абортогенных живых вирусов, а также общего предупреждения об анафилаксии, но может также касаться предупреждения оператора о болезненности или отеке в месте введения или транзиторной лихорадке либо об отказе от корма в отдельных случаях. В инструкциях по применению вакцин против ТГ, зарегистрированных в настоящее время, особые меры предосторожности отсутствуют.

## **7.3 Испытания готового лекарственного препарата**

7.3.1 Безопасность

Определение безопасности обычно проводят на мышах и/или морских свинках или свиньях (9 CFR 113:33; работа Витте, 1971 год). Также выполняют испытание готового лекарственного препарата на стерильность.

7.3.2 Активность

Не существует единой методики определения активности при выпуске. Вне зависимости от типа применяемого метода, он должен коррелировать с защитой макроорганизма (исследования эффективности). Активность живых вакцин для профилактики ВТГ может оцениваться методом in vitro титрования вирусной инфекционной дозы в клеточной культуре (Saif, 1993). Этот титр должен коррелировать с минимальным титром вируса, который необходим для формирования защитного иммунитета против экспериментального заражения, а также против естественного заражения в полевых условиях. Активность убитых вакцин оценивается в исследованиях вакцинации и заражения с использованием различных доз вакцины. Титры нейтрализующих антител, вызванные прививкой вакцины лабораторным животным, могут быть приняты, если есть установленная корреляция с развитием защитного иммунитета.

В убитых вакцинах возможно количественное определение конкретных вирусных антигенов, связанных с индукцией выработки нейтрализующих антител и защитой против заражения, с использованием специфичных моноклональных антител в твердофазном ИФА, например, моноклональных антител к белку S ВТГ; (Saif, 1993).

|  |
| --- |
| **МКС 11.220** |
|  |
| **Ключевые слова:** трансмиссивный гастроэнтерит свиней, болезни животных, идентификация возбудителя |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220** |
|  |
| **Ключевые слова:** трансмиссивный гастроэнтерит свиней, болезни животных, идентификация возбудителя |

**РАЗРАБОТЧИК**

РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Заместитель**  **Генерального директора** |  | **Е.М. Амирханова** |
| **Руководитель**  **Департамента разработки НТД** |  | **А.Н. Сопбеков** |
| **Главный специалист**  **Департамента разработки НТД** |  | **А. О. Турумов** |