

### ГЛАВА 3.1.17.

#### БЕШЕНСТВО (ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ БЕШЕНСТВА)

---

##### РЕЗЮМЕ

*Бешенство является серьезным зоонозным заболеванием, методы диагностики которого были стандартизированы в международном масштабе. Так как при бешенстве значительных патогномических поражений и специфических постоянных признаков не наблюдается, то точный диагноз может быть поставлен только в лаборатории. Лабораторные методы лучше всего проводить на ткани центральной нервной системы (ЦНС), извлеченной из черепа (особенно, ствольная часть мозга, гиппокамп, таламус, кора головного мозга и продолговатый мозг). Необходимо исследовать набор образцов ЦНС. Самым важным компонентом является ствольная часть мозга.*

**Идентификация возбудителя:** *Идентификацию возбудителя предпочтительнее проводить посредством реакции флуоресцирующих антител. На смыв ткани мозга, предпочтительно извлеченной из нескольких частей центральной нервной системы, зафиксированной в ацетоне, капают одну каплю очищенного иммуноглобулина, предварительно конъюгированного с ресцинизотиоцианатом. Реакция флуоресцирующих антител обеспечивает надежные результаты диагностики всех штаммов вируса бешенства в 98-100% случаев, если используется сильный конъюгат. Что касается большого количества образцов, например, в случае эпизоотологического исследования, быстрые результаты можно получить посредством проведения ПЦР в специально оборудованных лабораториях.*

*Гистологические тесты показали наличие инфицированных нейронных клеток и эти процедуры должны выявить агрегаты вирусного материала (тельца Негри) в цитоплазме нейронов. Однако, методы гистологического исследования менее чувствительны по сравнению с иммунологическими методами, особенно, если речь идет об аутолизированных образцах. Соответственно, методы гистологического исследования нельзя больше рекомендовать для проведения первичной диагностики.*

*Если результаты, полученные в результате реакции флуоресцирующих антител, неопределенные или если имеет место воздействие вируса на человеческий организм, то рекомендуется проводить дальнейшие тесты (тесты на культуре клеток или заражение*

мышей) на том же самом образце или повторную реакцию флуоресцирующих антител на других образцах. В культуру монослоя восприимчивых клеток инокулируют пул нескольких тканей ЦНС, включая ствольную часть мозга. Реакция флуоресцирующих антител, проведенная после соответствующего инкубационного периода, должна показать наличие или отсутствие вирусного антигена. Или же новорожденных или 3-недельных мышей инокулируют интрацеребрально таким же пулом тканей и затем наблюдают в течение 28 дней. Причину смерти любой мыши, которая умирает в течение 5-28 дней после заражения, следует подтвердить посредством проведения реакции флуоресцирующих антител. Там, где это возможно, тесты по прививке мышей необходимо заменять на выделение вируса в культуре клеток.

Идентификацию агента можно дополнять идентификацией любых вариантных вирусных штаммов в специализированных лабораториях путём использования моноклональных антител, специфических зондов нуклеиновых кислот или полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием геномных областей. С помощью таких приёмов можно различать полевые и вакцинные штаммы и, возможно, идентифицировать географическое происхождение полевых штаммов. Эти очень чувствительные тесты должны проводиться высококвалифицированным персоналом в специализированных лабораториях.

**Серологические тесты:** Реакции вируснейтрализации (VN) в клеточных культурах являются тестами, предписанными для проверки реакции на вакцинацию до трансграничного перемещения животных и международной торговли. Результаты выражаются в международных единицах или эквивалентных единицах относительно международной стандартной антисыворотки. Альтернативным образом можно применять валидированные тесты, которые, как известно, коррелируют с реакциями, а именно, с иммуноферментными анализами с использованием антител к белку G или целому вирусу.

**Требования к вакцинам:** Ветеринарные вакцины против бешенства содержат или живой вирус, аттенуированный для индикаторных видов (таких как Flury низкого пассажа на яйцах, Flury высокого пассажа на яйцах, Street-Alabama-Dufferin или Kelev), или вирус, инактивированный химическими или физическими средствами. Они также представляют собой рекомбинантные вакцины. Вирус культивируют в яйцах с развивающимся эмбрионом или в клеточных культурах.

*Вакцины против бешенства обычно представлены в лиофилизированном виде, но инактивированные вирусные вакцины, предпочтительнее с адьювантом, могут храниться в жидкой форме.*

*Прежде, чем лицензировать разработанные вакцины, следует определить на животных целевых видов продолжительность иммунитета, выработанного в результате их применения. Вакцины должны обеспечить защитным иммунитетом, по крайней мере, на один год.*

*Что касается живых вирусных вакцин, должно быть установлено минимальное количество вируса, которое вырабатывает адекватный иммунный ответ.*

*Иммуногенность инактивированных вирусных вакцин определяют и контролируют путем проведения тестов, которые были разработаны Министерством сельского хозяйства США в Соединённых Штатах Америки или в Европейской Фармакопее. Готовые вакцины обоих типов подвергают тестированию на безвредность и отсутствие токсичности.*

*Что касается живых вакцин, которые производят для пероральной вакцинации диких (или домашних) животных, то необходимо доказывать их безопасность и эффективность на целевых животных и безопасность на животных, не являющихся целевыми.*

## **A. ВВЕДЕНИЕ**

Бешенство вызывает нейротропный вирус рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Эта болезнь передаётся всем млекопитающим. Так как бешенство передаётся людям, манипуляции со всем подозреваемым инфицированным материалом следует производить в соответствующих условиях обеспечения безопасности, точно определённых Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) (1996).

В пределах рода можно различить одиннадцать различных генетических линий, а именно, сам вирус классического бешенства (RABV), Lagos вирус летучих мышей (LBV), Mokola вирус (MOKV) и Duvenhage вирус (DUUV), Европейские лиссавирусы летучих мышей-1

(EBLV1) и тип-2 (EBLV2), австралийский вирус летучих мышей (ABLV), четыре лиссавируса (вирус Араван [ARAV], вирус Худжанд [KHUV], вирус Иркут [IRKV], западно-кавказский вирус летучих мышей [WCBV]), которые были выделены у мышей региона Евразии и недавно были признаны новыми видами лиссавирусов (ICTV). Кроме того, вновь идентифицированный лиссавирус (вирус летучих мышей Шимони) был выделен у летучей мыши в Кении (Кузьмин et al.2010) и ожидает официальной классификации. RABV распространен по всему миру и несет ответственность за огромное количество случаев заражения бешенством животных и людей. У других лиссавирусов более ограниченное географическое распространение и ограниченное количество хозяев, в основном они были выделены у летучих мышей. Однако, на сегодняшний день исследованные лиссавирусы вызывают клиническое заболевание, которое нельзя отличить от классического бешенства. Консервативные антигенные сайты на нуклеокапсидном белке позволяют распознать лиссавирусы при использовании современных коммерческих препаратов антирабических антительных конъюгатов, используемых для проведения диагностических тестов на ткани мозга.

Лиссавирусы были разделены на две филогруппы с определенной патогенностью и иммуногенностью (Badrane et al, 2001). Что касается RABV, DUVV, EBLV и ABLV, то консервативные антигенные сайты на поверхности гликопротеинов способствуют формированию перекрестной нейтрализации и перекрестного иммунитета посредством противорабической вакцинации. Наблюдалось ослабление защиты против IRKV, ARAV и KHUV (Hanlon et al. 2005) при вакцинации до заражения и профилактики после заражения классическим бешенством. Все вышеуказанные лиссавирусы были причислены к филогруппе 1. Противорабическая вакцинация формирует слабую защиту или не формирует перекрестную защиту против инфицирования членами филогруппы-2 (MOKV и LBV) вообще. Большинство противорабических антисывороток не нейтрализуют данные лиссавирусы (Badrane et al, 2001). WCBV не имеет перекрестной серологической реакции ни с одной из двух филогрупп. В лабораториях, работающих с лиссавирусами или подозрительным материалом, должны соблюдаться национальные правила противовирусной безопасности и биологической безопасности; они также должны работать в соответствии с руководством по патогенам 3й группы риска, описанным в Главе 1.1.4 *Биологическая безопасность и биологическая защита: Стандарт по управлению биологическим риском в ветеринарных лабораториях и вивариях.*

ВОЗ рекомендует проводить превентивную иммунизацию персонала, работающего с инфицированным или подозрительным материалом. Протокол иммунизации включает три инъекции, например, на 0<sup>ой</sup>, 7<sup>ой</sup> и 28<sup>ой</sup> день. Серологическую оценку иммунизации проводят через 1-3 недели после последней инъекции и проверяют каждые 6 месяцев, если речь идёт о лаборантах, или каждые 2 года, если речь идёт о других диагностах. В случае снижения титра ниже 0,5 международных единиц (МЕ) на мл следует проводить бустерную вакцинацию. При отсутствии серологического мониторинга режим вакцинации должен состоять из бустерной вакцинации через 1 год и последующих бустерных вакцинаций каждые 1-3 года.

Поскольку у домашних или диких животных отсутствуют клинические признаки или крупные патологоанатомические поражения, диагностика бешенства должна базироваться на лабораторном тестировании. Серологическое подтверждение инфекции редко бывает полезным для послеубойной диагностики по причине поздней сероконверсии и высокого уровня смертности среди животных-хозяев, хотя такие данные могут быть использованы для оценки сероконверсии после вакцинации и для эпизоотологических исследований.

## **В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

### **1. Идентификация агента.**

Клиническая картина может только вызвать подозрение в заболевании бешенством, так как признаки болезни не являются характерными и могут варьировать от одного животного к другому. Единственным способом проведения надёжной диагностики бешенства является идентификация вируса или некоторых его специфических компонентов с использованием лабораторных тестов.

Так как вирус бешенства быстро инактивируется, охлаждённые диагностические образцы должны переправляться в лабораторию с использованием самого быстрого из имеющихся способов. Условия перевозки должны считаться частью «диагностической цепочки бешенства» и должны соответствовать международному руководству.

Можно использовать несколько лабораторных методов, которые были детализированы и стандартизированы в четвёртом издании ВОЗ *Лабораторные методы диагностики бешенства* (ВОЗ, 1996). Методы отличаются по эффективности, специфичности и надёжности. Традиционно они используются для тестирования ткани головного мозга, но

они могут также применяться, с различной чувствительностью и специфичностью, для тестирования других органов (например, слюнных желёз). В головном мозгу антиген вируса бешенства главным образом локализуется в таламусе, варолиевом мосту и продолговатом мозгу. Рекомендуется отбирать и тестировать пул тканей головного мозга, который включает ствол головного мозга (Bingam & van der Merwe, 2002). Реакция иммунофлуоресцирующих антител является наиболее распространенным тестом для диагностики бешенства. Он был рекомендован ВОЗ и МЭБ и является чувствительным, специфичным и дешевым.

При манипуляциях с тканями центральной нервной системы, извлеченных из животных с подозрением на бешенство, необходимо принимать меры предосторожности. Необходимо носить перчатки и принимать соответствующие меры предосторожности, чтобы предотвратить аэрозольное распространение. Во избежание телесных повреждений и контаминации режущие инструменты, ножницы и скальпели необходимо использовать с осторожностью.

### **1.1. Отбор образцов головного мозга**

Обычно соответствующие образцы головного мозга отбирают после того, как сделано отверстие в черепе в помещении для проведения вскрытий. Предпочтительнее отбирать образцы гиппокампа, таламуса, коры головного мозга и продолговатого мозга. При некоторых обстоятельствах (например, в полевых условиях или при пробоотборе для больших эпизоотологических исследований) этот этап может не иметь практической ценности. В подобных случаях имеются два возможных метода отбора некоторого количества образцов головного мозга без вскрытия черепа:

#### **1.1.1. Метод отбора образцов головного мозга через затылочное отверстие**

Соломинку для питья диаметром 5 мм (Barrat & Blancou, 1988) или 2 мл одноразовую пластиковую пипетку вводят в затылочное отверстие по направлению к глазу. Образцы можно отбирать из продолговатого мозга, основания мозжечка, гиппокампа, коры головного мозга и продолговатого мозга. При использовании соломинки зажмите ее между пальцами, чтобы при извлечении избежать потери материала. Отбор образцов головного мозга крупного рогатого скота можно осуществлять с использованием «ложки или инструмента для головного мозга», разработанных специально для отбора образцов ткани при ГЭ КРС, при этом будет получен образец, подходящий как для диагностики ГЭ КРС и бешенства.

### 1.1.2 Метод отбора образцов головного мозга через глазницу

При этом методе (Montano Hirose et al., 1991) используется троакар для того, чтобы сделать отверстие в задней стенке глазницы, затем через это отверстие вводится пластиковая пипетка. В качестве образцов отбираются те же части головного мозга, что и при использовании предшествующего приёма, но образцы отбираются в противоположном направлении.

## 1.2. Транспортировка образцов

Транспортировка подозрительного материала должна осуществляться в соответствии с инструкциями по обращению с опасными товарами Международной ассоциации по воздушным перевозкам (IATA). Эти указания описаны в Главе 1.1.3 *Транспортировка образцов животного происхождения*.

Если нет возможности отправлять образцы в охлаждённом виде, можно использовать другие методы их сохранения. Выбор консерванта зависит от тестов, которые применяются для диагностики:

i) Формалин инактивирует вирус, поэтому нельзя проводить тесты по выделению, а диагностика зависит от использования модифицированной и менее чувствительной прямой реакции флуоресценции (FAT), ПЦР (меньшая чувствительность, чем у этих исследований), иммуногистохимии или гистологии (Warner et al., 1997);

ii) Инфекционность при комнатной температуре может сохраняться в течение нескольких дней, если материал головного мозга хранить в смеси 50% глицерина в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР). Смесь глицерина / ЗФР тормозит действие бактерий и таким образом защищает от химического и биологического влияния со стороны гниения. Эта смесь не защищает от снижения титра из-за термальных условий и, так как вирус бешенства является термолабильным, то его титр будет снижаться при хранении в глицерине / ЗФР. В тропиках в условиях обычной транспортировки эта защита может быть эффективной только в течение нескольких дней. Поэтому, если только это возможно, образцы следует держать в глицерине /

ЗФР в охлаждённом виде. Так как вирус не инактивируется глицерином / ЗФР, на этих образцах могут проводиться все лабораторные тесты.

iii) Альтернативой транспортировке образцов для проведения молекулярных методов исследования является использование системы FTA Gene Guard (Picard-Meyer et al., 2007). Бумага для FTA сохраняет ДНК вируса бешенства в матрице волокон и позволяет транспортировать образцы для дальнейшей характеристики штаммов бешенства при комнатной температуре без соблюдения особых правил биологической безопасности.

### **1.3. Лабораторные тесты**

#### **1.3.1. Иммуногистохимическая идентификация антигена вируса бешенства**

##### *i) Реакция флуоресцирующих антител*

Наиболее широко используемым для диагностики бешенства тестом является реакция флуоресцирующих антител, которая рекомендована как ВОЗ, так и МЭБ. Эту реакцию «золотого стандарта» можно проводить непосредственно на мазке и её можно использовать также для подтверждения присутствия антигена вируса бешенства в клеточной культуре или в ткани головного мозга мышей, которые были привиты для постановки диагноза. Реакция флуоресцирующих антител даёт надёжные результаты на свежих образцах в течение нескольких часов в более чем 95-99% случаев. Реакция флуоресцирующих антител обладает чувствительностью, специфичностью, и она является относительно дешевой. Чувствительность реакции флуоресцирующих антител зависит от образца (степени автолиза и от того, насколько полно были отобраны образцы головного мозга, см. Раздел В.1.) (Ваггат & Aubert, 1995), типа лиссавируса и квалификационных навыков диагностов. Для прямой диагностики бешенства мазки, приготовленные из объединенного образца ткани головного мозга, который включает ствол головного мозга, фиксируют в высококачественном охлаждённом ацетоне, в течение, по крайней мере 20 минут, затем сушат и окрашивают каплей специфического конъюгата в течение 30 минут при температуре 37°C. Флуоресцирующие конъюгаты против бешенства, которые имеются в продаже, представляют из себя поликлональные или моноклональные

конъюгаты, специфические для полного вируса или специфические для нуклеокапсидного белка вируса бешенства, конъюгированного с флуороформом, таким как флуоресцинизиотиоцианат. Затем, слайды, используемые в реакции флуоресцирующих антител, должны быть исследованы на специфическую флуоресценцию с использованием флуоресцентного микроскопа и фильтра, подходящего для длины волны специфической флуоресценции используемого флуоресцентного конъюгата, например, широко используемый FITC, который приводится в возбуждение при 490 nm и переизлучается при 510 nm. Специфические агрегаты нуклеокапсидного белка идентифицируются по специфичной флуоресценции связанного конъюгата. Рекомендуется, чтобы результаты каждого FAT слайда считывали два независимых обученных оператора. Конъюгаты флуоресцирующих антител могут изготавливаться на месте, но перед использованием их следует проверять на специфичность и чувствительность, включая их способность обнаруживать лиссавирусы помимо бешенства.

Реакцию флуоресцирующих антител можно использовать применительно к хранящимся в глицерине образцам после стадии отмыwania. Если же образец хранится в растворе формалина, тогда реакцию флуоресцирующих антител можно использовать только после того, как образец будет обработан протеолитическим ферментом (Warner et al., 1997). Однако реакция флуоресцирующих антител на фиксированных формалином и расщеплённых образцах всегда даёт менее надёжные результаты и является менее надёжной и более громоздкой по сравнению с реакцией флуоресцирующих антител на свежей ткани (Barrat, 1992). Если результаты реакции флуоресцирующих антител неопределённые или если имело место заражение человека, то рекомендуется проводить дальнейшие исследования на том же образце или повторить реакцию флуоресцирующих антител на других образцах. Это особенно важно, когда подтвержден автолиз или есть на него подозрение.

## *ii) Иммунохимические тесты*

Иммунопероксидазный метод может использоваться в качестве альтернативы реакции флуоресцирующих антител с той же самой чувствительностью (Lembo et al., 2006), но необходимо обратить внимание на риск получения неспецифических ложноположительных результатов. Этот риск можно существенно снизить путём

тщательной подготовки лаборантов. Следует также подчеркнуть, что постановка этого метода требует более длительной инкубации на один этап по сравнению с реакцией флуоресцирующих антител.

Пероксидазный конъюгат может применяться на срезах фиксированной формалином ткани для иммуногистохимических тестов.

*ii) Иммуноферментный анализ (ИФА)*

Одним из вариантов иммунохимического теста является иммуноферментный анализ (ИФА), с помощью которого обнаруживают антиген вируса бешенства. Он применяется для крупномасштабных эпизоотологических анализов (Xu et al., 2007). До начала использования необходимо проверять специфичность и чувствительность таких тестов для обнаружения местных преобладающих вариантов вируса. В случае контакта с человеком эти тесты должны использоваться в комбинации с подтверждающими тестами, такими как реакция флуоресцирующих антител или выделение вируса.

*iv) Реакция экспресс иммунодиагностики (RIDT)*

Реакция экспресс иммунодиагностики (RIDT), была разработана недавно (Kang et al., 2007). Этот простой тест может быть использован в полевых условиях и в развивающихся странах, обладающих ограниченными ресурсами для диагностики. Вообще, все тесты помимо реакции флуоресцирующих антител могут быть использованы только после проведения валидации в многочисленных лабораториях.

### **1.3.2. Обнаружение репликации вируса бешенства после инокуляции**

Эти тесты обнаруживают инфекционность тканевой суспензии в клеточных культурах или в лабораторных животных. Их следует использовать, если реакция флуоресцирующих антител даёт неопределённый результат или если реакция флуоресцирующих антител даёт отрицательный результат в случае известного заражения людей. Там, где возможно, выделение вируса на клеточной культуре должно считаться предпочтительнее тестирования путем заражения мышей. Тесты, проводимые на культуре клеток, такие же чувствительные, как и тесты путем заражения мышей (Rudd & Trimarchi, 1989), но менее дорогие, дают более быстрые результаты и в них не используются животные.

*i) Тестирование путём культивирования клеток*

Клетки нейробластомы, например, N2a CCL-131 в Коллекции культур американского типа (АТСС)<sup>1</sup>, являются высоко восприимчивыми к инфицированию лиссавирусами. Клетки выращивают в модифицированной Дульбекко среде Игла с 5% фетальной телячьей сывороткой (ФТС), инкубируют при 36<sup>0</sup>С с 5% СО<sub>2</sub>. Клеток почки хомячка (ВНК-21) также чувствительны к большинству уличных изолятов без какого-либо адаптационного этапа, но перед использованием их необходимо проверять на восприимчивость к вариантам вируса, преобладающим в определенном регионе. Тестирование путем культивирования клеток можно проводить с использованием многолуночных пластмассовых планшетов, многокамерных стеклянных слайдов и стеклянного покровного стекла. Чувствительность, аналогичная тестам путем заражения мышей для обнаружения штаммов бешенства (Rudd & Trimarchi, 1989), была продемонстрирована при использовании одного четырехдневного пассажа в 96-луночном планшете. Однако считается, что дополнительные пассажи могут увеличить чувствительность. Цитотоксичность является подтвержденным фактором, влияющим на надежность результатов тестирования. Методы, применяющиеся для снижения цитотоксичности, включают добавление антибиотиков, сокращение времени до смены среды (до 35 минут) и разведение образцов. Тестирование путём культивирования клеток и их варианты должны быть полностью валидированы до использования.

*Предлагаемый протокол для 96-луночного планшета:* К 200 мкл свежеприготовленного в четырех лунках 96-луночного планшета из субконфлуэнтной плашки  $2 \times 10^5$  клеток/мл суспензии добавляют 100 мкл очищенного гомогената мозга (20% в фосфатно-буферном растворе, 0,1 М, рН 7,4). Через 24 часа инкубации при 5% СО<sub>2</sub> и температуре 37<sup>0</sup>С супернатант удаляют из каждой лунки и в каждую лунку добавляют 200 мкл свежей среды. Через следующие 72 часа инкубации супернатант удаляют пипеткой и хранят. Клетки фиксируют в 80% ацетоне и окрашивают флуоресцирующими антителами в соответствии с рекомендациями производителя. Варианты включают сокращение времени инкубации до смены среды для уменьшения токсичности клеток, использование агентов клеточной проницаемости (например, DEAE-dextran) и дальнейшие

---

<sup>1</sup> Коллекции культур американского типа (АТСС), P.O.Box 1549, Manassas, Virginia 20108, Соединенные Штаты Америки

пассажи. Считается, что чувствительность может быть увеличена тремя пассажами.

*Предлагаемый протокол для использования в 8-камерных слайдах Lab-Tek®:* К 400 мкл свежеприготовленного из суб-конфлюэнтной плашки  $10^5$  клеток/мл суспензии добавляют 50 мкл очищенного гомогената мозга (20% в измельчающем субстрате, приготовленном из фосфатно-буферного раствора, 0,1 М, pH 7,4 термоактивированной сывороткой новорожденного теленка). Через 24 часа инкубации при 5% CO<sub>2</sub> и температуре 35,5°C супернатант удаляют из каждой лунки и в каждую лунку добавляют 400 мкл свежей среды. Через следующие 24 часа инкубации (или более) удаляют супернатант, структуру камеры, клеточный слой высушивают и фиксируют чистым высококачественным холодным ацетоном. Затем клеточный слой окрашивают флуоресцирующими антителами в соответствии с лабораторными процедурами. Варианты включают время инкубации, использование агентов клеточной проницаемости (например, DEAE-dextran) и дальнейшие пассажи. Удаленные супернатанты должны храниться для последующих пассажей.

i) Тестирование путём заражения мышей

От трех до десяти мышат в возрасте 3-4 недель (12-14 г) или помёт 2-дневных новорожденных мышат прививают интрацеребральным способом. Посевной материал представляет из себя осветлённую надосадочную жидкость 10-20% (в/о) гомогената материала головного мозга включая мозговой ствол (кора головного мозга, аммонов рог, мозжечок, продолговатый мозг) в изотоническом буферном растворе, содержащем антибиотики. При проведении прививки мышам следует давать наркоз. За мышами проводят ежедневное наблюдение в течение 28 дней, а каждую погибшую мышь исследуют с помощью реакции флуоресцирующих антител на наличие бешенства. Для получения более быстрых результатов на новорожденных мышатах можно тестировать одного мышонка с помощью реакции флуоресцирующих антител на 5, 7, 9 и 11<sup>ый</sup> день после инокуляции. Все случаи гибели в течение первых 4х дней считаются неспецифическими (из-за стрессовой/бактериальной инфекции и т.д.).

Если в лаборатории есть подразделение для проведения тестирования путем культивирования клеток, то, там, где возможно, необходимо заменить тест путем

заражения мышей на тест путем культивирования клеток, так он не предполагает использование живых животных, является менее дорогостоящим и дает более быстрые результаты. Однако, преимущество теста путем заражения мышей состоит в том, что когда результаты теста положительные, то с целью идентификации штамма большое количество вируса можно изолировать из одного мышинового мозга. Кроме того, он может быть использован в ситуациях, когда опыта и оборудования для проведения других тестов (например, культивирования клеток) недостаточно. Используя тест путем заражения мышей помимо вируса бешенства можно обнаружить другие вирусы.

### **1.3.3. Методы молекулярной диагностики**

Различные молекулярные диагностические тесты, например, обнаружение вирусной РНК посредством ПЦР с обратной транскрипцией (РТ-ПЦР), ПЦР-ИФА, гибридизации *in situ* и ПЦР в реальном времени, используются в качестве экспресс методов и дополнительных чувствительных методов для диагностики бешенства (Fooks *et al.*, 2009). Принцип лиссавирус специфической ПЦР состоит в обратной транскрипции целевой РНК (обычно части гена N) в комплементарную ДНК с последующей амплификацией кДНК с использованием ПЦР. Хотя эти молекулярные тесты имеют самый высокий уровень чувствительности, в настоящее время не рекомендуется их использовать для проведения плановой послеубойной диагностики бешенства (ВОЗ, 2005) из-за высоких уровней ложно-положительных или ложно-отрицательных результатов без стандартизации и очень строгого контроля качества. Тем не менее, будучи первым этапом типирования вируса, они полезны для подтверждающей диагностики (см. ниже).

### **1.3.4. Гистологическая идентификация клеточных поражений**

Тельца Негри аналогичны скоплению вирусных белков, но классические методы окрашивания могут обнаружить только сходство этих структур с точки зрения ацидофильного окрашивания. Методы, применяемые для окрашивания частей погруженных в парафин клеток мозга (например, метод Mann), являются времязатратными, менее чувствительными и более дорогими, чем реакция флуоресцирующих антител. Метод Seller на незафиксированных образцах ткани имеет очень низкую чувствительность и подходит только для самых свежих образцов. Использование этих методов больше не рекомендуется для плановой

диагностики. Иммуногистохимические тесты являются единственными гистологическими методами специфичными к бешенству.

#### **1.4. Другие тесты для идентификации**

Упомянутые выше тесты описывают методы точной диагностики бешенства, а также изоляции и идентификации вируса. Типирование вируса может способствовать получению полезной эпизоотологической информации и должно осуществляться в специализированных лабораториях (таких как референтные лаборатории МЭБ или ВОЗ). Эти методы включают использование МАт, зондов нуклеиновых кислот или полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим ДНК - секвенированием геномных областей для типирования вируса (Bourhy et al., 1993). Это позволяет проводить различие между вакцинным вирусом и полевым штаммом вируса и, возможно, устанавливать географическое происхождение последнего.

Приветствуется участие в межлабораторных сличительных испытаниях в рамках системы обеспечения качества: такие тесты должны быть организованы для Региональных Лабораторий Национальной Референтной Лабораторией, в то время как последние, в свою очередь, должны участвовать в международных сличительных испытаниях, организованных референтными лабораториями МЭБ.

## **2. Серологические тесты**

Основное применение серологии в отношении классического бешенства состоит в определении реакции на вакцинацию как у домашних животных до международных перевозок, так и у популяций диких животных после пероральной иммунизации. В соответствии с рекомендациями ВОЗ (ВОЗ, 1985) минимальный измеримый титр антител, представляющий уровень иммунитета у человека, способный защитить от инфицирования бешенством, составляет 0,5 МЕ/мл антител против вируса бешенства. Для подтверждения удовлетворительной реакции на вакцинацию та же процедура проводится на собаках и кошках. Так как нейтрализующие антитела являются ключевым компонентом адаптивной иммунной реакции против вируса бешенства (Hooper et al., 1998), то реакция вируснейтрализации (РН) является исследованием золотого стандарта. Однако был разработан непрямой иммуноферментный метод ИФА, который не требует наличие лабораторий с высоким уровнем защиты и дает быстрые результаты. Необходимо быть внимательным при сравнении результатов

реакции вируснейтрализации и ИФА, т.к. между ними существует значительное различие. В многочисленных публикациях говорится о переменной чувствительности и специфичность методов ИФА как у животных, так и у человека. Несмотря на то, что там, где требуется специфическая оценка защиты, рекомендуется проводить РН, для определения реакции на вакцинацию проведение обоих методов является полезным, при условии, что используются соответствующие точки раздела. Сыворотка плохого качества может быть причиной цитотоксичности РН, что может привести к ложноположительным результатам. Было доказано, что для таких образцов непрямой метод ИФА может быть таким же чувствительным и таким же специфическим, как и реакция вируснейтрализации (Servat et al., 2007).

Серологические анализы так же используются для получения информации по динамике лиссавирусов у летучих мышей, но все еще требуется стандартизация серологических тестов, проводимых на летучих мышах.

## **2.1 Реакция вируснейтрализации в культуре клеток: реакция вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами (тест, предписанный для международной торговли)**

Принцип реакции вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами (Clignet et al., 1998) заключается в нейтрализации *in vitro* постоянного количества вируса бешенства (штамм «стандарта контрольного вируса», адаптированный к клеточной культуре) перед инокуляцией клеток, чувствительных к вирусу бешенства: клеток ВНК-21 С13 (номер АТСС: CCL-10).

Титр сыворотки - это разведение, при котором 100% вируса нейтрализуется в 50% лунках. Этот титр выражается в МЕ/мл в результате сравнения его с нейтрализующим разведением сыворотки МЭБ собачьего происхождения в тех же экспериментальных условиях. Можно использовать стандарт ВОЗ для иммуноглобулина бешенства (человека)<sup>2</sup> № 2, или внутренний контроль, откалиброванный против международного контроля. Стандарт ВОЗ или внутренний контроль должны использоваться при проведении теста только в качестве контроля, а не для подсчета МЕ/мл титра сыворотки.

---

<sup>2</sup> Национальный институт биологических стандартов и контроля (NIBSC). Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Соединенное Королевство (UK).

При постановке этого метода используют 96-луночные планшеты, а сам он является адаптацией метода Smith *et al.* (1973). В нескольких публикациях было показано, что реакция вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами и быстрая реакция подавления флуоресцирующего фокуса дают эквивалентные результаты (Clquet *et al.*, 1998).

### 2.1.1. Необходимое оборудование

Влажный инкубатор при 37<sup>0</sup>C\37<sup>0</sup>C с 5% CO<sub>2</sub>; сухой инкубатор при 37<sup>0</sup>C; шкаф для работы с биоматериалом; флуоресцентный микроскоп, подходящий для флуоресценции с флуоресцеин изотиоцианатом и оборудованный x10 окуляром и x10 объективом. Увеличение микроскопа варьирует от x100 до x125 из-за дополнительного увеличения некоторых эпифлуоресцентных систем.

- **Реактивы и биологические препараты**

ЗФР, рН 7,2, без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, хранящийся при 4<sup>0</sup>C;

Трипсин этилен диамин тетрауксусная кислота (EDTA);

Высококачественный ацетон 80% (разведённый деионизированной водой), хранящийся при 4<sup>0</sup>C;

Модифицированная Дульбекко среда Игла + 10% инактивированная высокими температурами фетальная телячья сыворотка;

Флуоресцеин изотиоцианат антикроличий конъюгат;

Клетки: ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10), хранящиеся в GMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой и антибиотиками;

Вирус: Штамм стандарта контрольного вируса - 11 (АТСС VR 959), который можно получить из АТСС или Справочной лаборатории МЭБ по бешенству, Нэнси, Франция (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*). Пузырьки хранят при -80<sup>0</sup>C;

Стандарт сыворотки МЭБ собачьего происхождения (Справочная лаборатория МЭБ по бешенству, Нэнси, Франция [см. Таблицу в Части 3 данного *Руководства по наземным животным*], хранящийся при +4<sup>0</sup>С и разведённый до 0,5 МЕ/мл стерильной деионизированной или дистиллированной водой согласно титру партии). Данная контрольная сыворотка может быть использована для калибровки внутреннего контроля, который применяется для реакции вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами:

Незаражённая сыворотка: Пул отрицательной собачьей сыворотки хранится при - 20<sup>0</sup>С.

### **2.1.3. Получение стандарта контрольного вируса**

- i) *Выращивание клеток:* ВНК-21 С13 клетки (АТСС ССL-10), используемые для получения стандартного контрольного вируса (АТСС VR 959 CVS-11), подвергают трипсинизации во время фазы быстрого роста, а именно тогда, когда клетки находятся в экспоненциальной фазе их кинетического роста. Если слияние слоя полное, тогда необходимо провести новый пассаж. Клетки в клеточной суспензии не должны агрегироваться; в одном 75-см<sup>3</sup> флаконе для клеточной культуры должно находиться 2 x 10<sup>7</sup> клеток. Клетки в объёме 20-30 мл помещают в клеточную культуральную среду с 10% инактивированной высокими температурами фетальной телячьей сывороткой.
- ii) *Заражение клеток:* множественность заражения (количество инфекционных частиц на клетку) подгоняется под диапазон между 0,1 и 0,5. Стекланную бутылочку, содержащую суспензию вируса и клеток, инкубируют в течение 60 минут при 35,5 – 37<sup>0</sup>С. Содержимое бутылочки осторожно помешивают каждые 10-15 минут.
- iii) *Выращивание вируса:* суспензию вируса и клеток затем центрифугируют при 800 – 1000 g в течение 15 минут и клеточный осадок ресуспендируют в клеточной культуральной среде, смешанной с 10% инактивированной высокими температурами фетальной телячьей сывороткой. Урожай вируса собирают 2 дня спустя.

- iv) *Сбор урожая и хранение:* надосадочную жидкость центрифугируют при 800 – 1000 *g* в течение 15 минут при 4<sup>0</sup>С. Если используются несколько флаконов, тогда различные отцентрифугированные надосадочные жидкости смешивают, а затем делят на равные части и замораживают при –80<sup>0</sup>С. Инфекционный титр урожая определяют, по меньшей мере, через 3 дня после замораживания.

#### **2.1.4. Титрация вируса в ТЦД<sub>50</sub> (50% инфицирующая культуру ткани доза)**

При этом методе титрации используют клетки ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10) на титрационных микропланшетах.

Различные этапы данной процедуры можно адаптировать в соответствии с требованиями безопасности и рабочей практикой лаборатории, но не надо менять следующее:

- инокуляция 24-часового клеточного слоя,
- десятикратные разведения, приготовленные с использованием 0,9 мл разбавителя и 0,1 мл вирусной суспензии,
- от четырех до шести 50 мкл воспроизведений на разведение,
- инкубирование в течение 72<sup>х</sup> часов,
- качественное считывание результатов (а именно, являются ли лунки положительными или отрицательными),
- при каждой титрации титруется пузырёк с вирусом контрольной серии и этот титр вносится в контрольную карточку для валидации процесса титрации,
- вычисление проводят согласно неопробит-графическому методу или методу Spearman-Kärber.

- i) *Клеточная суспензия:* за день до титрации готовят клеточную суспензию, содержащую 10<sup>5</sup> клеток/мл, в клеточной культуральной среде, содержащей 10% инактивированную высокими температурами ФТС, и переносят на 96-луночные титрационные микропланшеты из расчёта 200 мкл на лунку. Планшеты затем инкубируют в течение 24 часов при 35,5<sup>0</sup>С-37<sup>0</sup>С с 5% СО<sub>2</sub>.

- ii) *Разведение вируса:* серийные разведения проводят в 5 мл пробирках с использованием клеточной культуральной среды без ФТС в качестве

разбавителя. Готовят десятикратные разведения от  $10^{-1}$  до  $10^{-12}$  (0,9 мл разбавителя с 0,1 м предшествующего разведения).

- iii) *Заражение клеток:* среду удаляют с титрационных микропланшетов с использованием системы отсасывания жидкости. В каждую лунку помещают 50 мкл каждого разведения вируса. На каждое разведение используют шесть воспроизведений. Затем титрационный микропланшет инкубируют в течение 1 часа при  $35,5 - 37^{\circ}\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$ . Затем добавляют 200 мкл клеточной культуральной среды, содержащей 5% ФТС.
- iv) *Инкубирование:* инкубирование проводят в течение  $3^x$  дней при  $35,5 - 37^{\circ}\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$ .
- v) *Окрашивание и вычисление титра:* Клетки окрашивают с помощью реакции флуоресцирующих антител, как это подробно изложено ниже. Подсчёт качественный, каждая лунка, которая демонстрирует специфическую флуоресценцию, считается положительной. Вычисление титра производится с использованием неопробит-графического метода или формулы Spearman-Kärber (ВОЗ, 1996).
- vi) Титрация стандарта контрольного вируса должна проводиться посредством реакции вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами для установления инфицирующей дозы ЦПД<sup>50</sup>.

### 2.1.5. Процедура проведения теста

- i) Микропланшеты применяют в соответствии с образцом Рисунка 1. Планшет №1 используется для титрования стандарта контрольного вируса (ряды с 1 по 4), для контролей, стандартных сывороток и незаражённой собачьей сыворотки. Другие планшеты используются для тестируемых сывороток.
- ii) Среду добавляют в лунки следующим образом: планшет 1, ряды с 1 по 4 и лунки с А 9 по А12: 150 мкл на лунку; другие планшеты, ряды 6 и 12: 200 мкл на лунку; и другие лунки: 100 мкл.

iii) Тестируемые сыворотки подвергают термоинактивации в течение 30 минут при 56<sup>0</sup>С. Как указано на Рисунке 1, 50 мкл каждой неразведённой опытной сыворотки добавляют в четыре соседние лунки.

iv) Разведения сыворотки проводят на микропланшетах следующим образом:

Сыворотка МЭБ, сыворотка ВОЗ, внутренний контроль и незаражённая собачья сыворотка: с помощью 50-200 мкл многоканальной пипетки перемешайте первое разведение путём всасывания и выливания, по меньшей мере, восемь раз, переносите 50 мкл из одного ряда в следующий ряд до тех пор, пока не дойдёте до последнего. Удалите 50 мкл из последнего ряда.

Если на контрольном планшете есть тестируемая сыворотка, посмотрите ниже на этап разведения.

Требуется, как минимум, четыре трехкратных разведения.

Тестируемые сыворотки (все планшеты): как это указано выше, перенесите последовательно 50 мкл из одного ряда в следующий до рядов 5 и 11 (разв. 10<sup>-2,39</sup>). С помощью 5-50 мкл многоканальной пипетки перенесите 10 мкл из рядов 5 и 11 в ряды 6 и 12, соответственно (из разв. 10<sup>-2,39</sup> в разв. 10<sup>-4,23</sup>). С помощью многоканальной пипетки, установленной на 90 мкл, смешайте сыворотки рядов 6 и 12 и выбросьте 180 мкл. Затем добавьте в эти ряды 70 мкл среды. Этот конечный этап не годится для тестирования с высокой пропускной способностью. Для того, чтобы получить или превысить рекомендуемое конечное разведение, можно использовать альтернативные процедуры. Они могут потребовать модификаций в разбивке планшета.

*Рис.1. Предлагаемое использование микропланшетов для реакции вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами. Лунки, в которые вносят неразведённые сыворотки, помечены «50 мкл». Лунки, в которые должны быть добавлены 50 мкл разведённого стандарта контрольного вируса, заштрихованы. Разведения выражены в log<sub>10</sub>.*

**Планшет 1: Контроли**

<b>Титрование стандарта контр.вируса</b>	<b>Н</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>C</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	
									<b>1</b>
									<b>2</b>

									<b>3</b>		
									<b>4</b>		
<b>МЭБ станд.сыворот. (0,5 МЕ/мл)</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>			<b>5</b>	<b>Незараж. собачья сыворотка (отриц.)</b>
	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>			<b>6</b>	
	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>			<b>7</b>	
	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>			<b>8</b>	
<b>Внутренний положит. Контроль или стандарт. Сыворотка ВОЗ</b>	<b>50мкл</b>									<b>9</b>	
	<b>50мкл</b>									<b>10</b>	
	<b>50мкл</b>									<b>11</b>	
	<b>50мкл</b>									<b>12</b>	

log (разведение)    0,48    0,95    1,43    1,91    2,39    2,87    Контроль вируса CVS клеток

**Планшет 2: Тестируемые сыворотки**

Log разведения    0,48   0,95   1,43   1,91   2,39   **4,23**    0,48   0,95   1,43   1,91   2,39   **4,23**

		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	
<b>Сыв.1</b>	<b>A</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						<b>Сыв.3</b>
	<b>B</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						
	<b>C</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						
	<b>D</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						
<b>Сыв.2</b>	<b>E</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						<b>Сыв.4</b>
	<b>F</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						
	<b>G</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						
	<b>H</b>	<b>50мкл</b>						<b>50мкл</b>						

### 2.1.6. Добавление стандарта контрольного вируса

- i) Исходный стандарт контрольного вируса храните в 1мл микропробирках при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Содержимое одной пробирки подвергните быстрому оттаиванию под холодной водопроводной водой и поместите на тающий лёд.
- ii) Из этой пробирки приготовьте одно разведение с целью получения 100 ТЦД<sub>50</sub> в 50 мкл. Из этого разведения в каждую наполненную сывороткой лунку добавьте 50 мкл (см. Рисунок 1). Для титрования вируса в лунки от Н1 до Н4 (планшет 1) добавьте 50 мкл. Затем переносите 50 мкл из ряда в ряд (планшет 1, линии 1-4). Удалите 50 мкл из последнего ряда (планшет 1, лунки от А1 до А4). К лункам от А9 до А12 планшета 1 (контроли) вирус не добавлять. Титр вирусной дозы должен находиться в пределах от 30 до 300 ТЦД<sub>50</sub> в 50 мкл.
- iii) Инкубируйте микропланшеты при  $35-37^{\circ}\text{C}$  во влажном инкубаторе с 5%  $\text{CO}_2$  в течение 1 часа.
- iv) *Добавление клеток:* подвергните трипсинизации субконфлюэнтную культуру ВНК-21 клеток. Ресуспендируйте клетки до получения суспензии  $4 \times 10^5$  клеток/мл в модифицированной Дульбекко среде Игла, обогащённой 10% инактивированной высокими температурами ФТС. Добавьте 50 мкл клеточной суспензии в каждую лунку.
- v) Инкубируйте микропланшеты в течение 48 часов при  $35-37^{\circ}\text{C}$  во влажном инкубаторе с 5%  $\text{CO}_2$ .

### 2.1.7. Фиксация и окрашивание

- i) Через 48 часов инкубационного периода среду выбрасывают и микропланшеты ополаскивают один раз в ЗФР, рН 7,2, и один раз в 80% ацетоне. Затем микропланшеты фиксируют в 80% ацетоне при комнатной температуре в течение 30 минут (без крышки) и сушат при комнатной температуре, по меньшей мере, в течение 30 минут.

- ii) Добавьте 50 мкл флуоресцеин изотиоцинат антирабического конъюгата в рабочем разведении в каждую лунку, осторожно покачайте микропланшеты и инкубируйте при 35-37<sup>0</sup>C в течение 30 минут. Удалите флуоресцирующий конъюгат и ополосните микропланшеты дважды с использованием ЗФР. Излишки ЗФР удалите на абсорбирующую бумагу путём быстрого переворачивания микропланшетов.

### **2.1.8. Считывание и интерпретация результатов**

- i) Наблюдение проводят за всей поверхностью каждой лунки. Результат оценивается качественным образом (плюс или минус): отсутствие флуоресцирующих клеток – минусовой счёт регистрируется в отношении лунки; наличие флуоресцирующих клеток (одна клетка или более) – плюсовой счёт регистрируется в отношении лунки.
- ii) Сначала снимают показания с контрольных лунок. В контрольных лунках проводят титрование стандарта контрольного вируса, незаражённой сыворотки и стандартных сывороток (стандартная сыворотка ВОЗ и/или стандартная сыворотка МЭБ), титры подсчитывают в соответствии с методом Spearman-Kärber или неопробит-графическим методом (ВОЗ, 1996).
- iii) Результаты титрования стандарта контрольного вируса (ТЦД<sub>50</sub>), незаражённой сыворотки (D<sub>50</sub> [средняя доза]) и положительного стандарта (D<sub>50</sub>) регистрируют в контрольной карточке для каждого из этих трёх контролей. Контрольные результаты текущего теста сравнивают с контрольными опытными результатами, накопленными при проведении предшествующих тестов с использованием той же серии контроля. Тест можно считать прошедшим валидацию, если значения, полученные для трёх контролей текущего теста, статистически не отличаются от средней величины всех значений, полученных в тестах, которые были проведены ранее в соответствии с этим методом.
- iv) Результат теста соответствует не нейтрализованному вирусу после инкубирования с референтной сывороткой или с опытной сывороткой. Эти титры подсчитывают с использованием неопробит-графического метода или формулы Spearman-Kärber (ВОЗ, 1996). Сравнение измеренного титра опытных сывороток с

известным нейтрализующим титром положительной стандартной сыворотки позволяет определить нейтрализующий титр опытных сывороток в МЕ/мл. Перевод в МЕ/мл осуществляется посредством использования как дневной величины  $\log D_{50}$ , так и средней величины стандартной сыворотки МЭБ.

### 2.1.9. Формула для перевода $\log D_{50}$ в МЕ/мл титра:

$$\text{Титр сыворотки (МЕ/мл)} = \frac{[(10^{(\text{величина сыворотки } \log D_{50})}) \times \text{теоретический титр сыворотки МЭБ } 0,5 \text{ МЕ/мл}]}{(10^{(\log D_{50} \text{ сыворотки МЭБ } 0,5 \text{ МЕ/мл})})}$$

Пример перевода величин:

$$\log D_{50} \text{ сыворотки} = 2,27$$

$$\text{теоретический титр сыворотки МЭБ } 0,5 \text{ МЕ/мл} = 0,5 \text{ МЕ/мл}$$

$$\log D_{50} \text{ сыворотки МЭБ} = 1,43$$

(для  $\log D_{50}$  МЭБ могут учитываться как величина дня, так и средняя величина)

$$\text{Титр сыворотки (МЕ/мл)} = \frac{10^{2,27 \times 0,5}}{(10^{1,43})} = 3,46 \text{ МЕ/мл}$$

Следует строго соблюдать следующие параметры:

- Вирус бешенства: могут быть использованы только штамм CVS-11
- Клеточная культура: могут быть использованы только клетки ВНК-21 (номер ATCC-CCL 10).
- Реакция флюоресценции вируснейтрализующих антител (FAVN) должен проводиться только в 96-луночном планшете.
- Контрольные карты должны использоваться для вируса бешенства, незараженной сыворотки и положительной стандартной собачьей сыворотки.
- На контрольном планшете должны быть представлены обратное титрование стандарта контрольного вируса, незараженная сыворотка и положительная стандартная собачья сыворотка.
- Требуется минимум четыре трехкратных разведений сыворотки. Метод считывания работает по принципу «все или ничего».
- Должно быть разведено четыре репликата каждой сыворотки.
- Для перевода  $\log D_{50}$  в МЕ/мл лаборатории должны использовать только величину  $\log D_{50}$  положительной стандартной собачьей сыворотки.

## **2.2. Быстрая реакция подавления флуоресцирующего фокуса для определения нейтрализующих вирус бешенства антител (предписанный для международной торговли тест)**

**Стандартная процедура (из «Лабораторных методов ВОЗ для бешенства», 1996)**

### **2.2.1. Приготовление суспензии посевного вируса**

- i) Подвергните трипсинизации 150 мл флакон с 3-дневной культурой клеток нейробластомы мышей<sup>3</sup>. Схожую клеточную линию (CCL-131) можно запросить из ATCC (См. сноску 1).
- ii) Ресуспендируйте  $3 \times 10^7$  клеток в 50 мл конической центрифужной пробирке в 2,7 мл минимальной эссенциальной среде Игла, обогащённой 10% фетальной телячьей сывороткой (EMEM – 10).
- iii) Применяя стандартные процедуры безопасности в отношении бешенства, добавьте  $1 \times 10^7$  инфекционных единиц стандарта контрольного вируса бешенства - 11 (предварительный ATCC референтный VR959) и вихревым движением перемешайте один раз. Инкубируйте клетки и вирус в течение 15 минут при 37<sup>0</sup>C; вихревым движением перемешайте клетки один раз в течение этого периода времени.
- iv) Добавьте 10 мл EMEM - 10, вихревым движением перемешайте и центрифугируйте клетки при 500 g в течение 10 минут.
- v) Удалите надосадочную жидкость. Ресуспендируйте клетки в 30 мл ростовой среды и перенесите в 150 мл флакон.
- vi) Осторожно покачайте флакон для того, чтобы перемешать клеточную суспензию, а затем подготовьте три предметных восьмилучных стекла для культуры ткани путём переноса с помощью пипетки 0,2 мл клеточной суспензии в одну лунку каждого предметного стекла.

- vii) Инкубируйте флакон и предметные стёкла при 37°C во влажном инкубаторе с 0,5% двуокисью углерода (CO<sub>2</sub>). Флакон следует инкубировать как закрытую культуру (плотно закройте крышку).
- viii) Через 20, 40 и 64 часа после заражения зафиксируйте ацетоном и окрасьте один слайд с использованием реакции иммунофлуоресценции (Cliquet et al., 1998) с целью определения инфекционности вируса. Надосадочную жидкость следует собирать через 24 часа после того, как клетки достигнут 100% инфекционности (обычно через 40 часов после заражения).
- ix) Перенесите надосадочную жидкость в 50 мл центрифужную пробирку и центрифугируйте при 4000 g в течение 10 минут.
- x) Поделите надосадочную жидкость на 0,5 мл равные части и храните при - 70°C.

### **2.2.2. Титрование суспензии посевного вируса**

- i) Оттайте одну аликвоту посевного вируса и приготовьте серийные десятикратные разведения (от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>) в ЕМЕМ-10.
- ii) Поместите 0,1 мл каждого разведения вируса в одну лунку восьмилуночного предметного стекла для культуры ткани. Добавьте 0,2 мл клеток нейробластомы мышей, суспендированных в ЕМЕМ -10 (концентрация 5 x 10<sup>4</sup> клеток на 0,2 мл), в каждую лунку.
- iii) Перемешайте клетки и вирус путём осторожного покачивания предметного стекла, затем инкубируйте при 37°C во влажном инкубаторе с 0,5% CO<sub>2</sub> в течение 40 часов.
- iv) Зафиксируйте ацетоном и окрасьте предметное стекло с помощью реакции иммунофлуоресценции. Наличие вирусной инфекции должно наблюдаться при 10<sup>-6</sup> разведении вируса, это будет свидетельствовать о том, что вирусная исходная суспензия содержит, по меньшей мере, 1x10<sup>6</sup> инфекционных единиц на 0,1 мл. Приготовьте достаточное количество посевного вируса с тем, чтобы отпала необходимость частого серийного пассирования вируса.

### 2.2.3. Приготовление исходной вирусной суспензии

- i) Заразите  $3 \times 10^7$  клеток нейробластомы мышей  $1 \times 10^7$  инфекционными единицами препарата посевного вируса (см. выше).
- ii) Соберите надосадочную жидкость через 24 часа после того, как клетки достигнут 100% инфекционность (обычно через 40 часов после заражения).
- iii) Разделите надосадочную жидкость на равные части по 0,5 мл и храните при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.4. Титрование исходной вирусной суспензии

- i) Оттайте одну аликвоту исходного вируса и используйте её для приготовления серийных десятикратных разведений (от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ) в ЕМЕМ-10.
- ii) Поместите 0,1 мл каждого вирусного разведения в одну лунку восьмилуночного предметного стекла для культуры ткани. Добавьте 0,2 мл клеток нейробластомы мышей, суспендированных в ЕМЕМ-10 (концентрация  $1 \times 10^5$  клеток на 0,2 мл), в каждую лунку.
- iii) Перемешайте клетки и вирусную суспензию путём осторожного покачивания предметного стекла, затем инкубируйте при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажном инкубаторе с 0,5%  $\text{CO}_2$  в течение 20 часов.
- iv) Зафиксируйте ацетоном и окрасьте с помощью реакции иммунофлуоресценции.

При проведении наблюдения с помощью микроскопа с увеличением  $\times 160-200$  можно видеть, что каждая лунка восьмилуночного предметного стекла для культуры ткани содержит 25-50 отдельных микроскопических полей. Одна единица вируса для быстрой реакции подавления флуоресцирующего фокуса определяется как разведение, при котором 50% наблюдаемых микроскопических полей содержат один или более фокусов инфицированных клеток (фокусобразующая доза,  $\text{ФОД}_{50}$ ). Исходная вирусная суспензия

должна содержать, по меньшей мере,  $1 \times 10^4$  ФОД<sub>50</sub> в 0,1 мл (а именно, лунка с клетками, инфицированными  $10^{-4}$  разведением вируса, должна содержать, по меньшей мере, один фокус инфицированных клеток в 50% наблюдаемых микроскопических полей). Исходную вирусную суспензию с таким титром можно затем развести до  $10^{-2,3}$  с целью получения контрольного вируса, содержащего 50 ФОД<sub>50</sub>.

### **2.2.5. Референтные сыворотки**

В каждый тест следует включать национальный или международный референтный сывороточный стандарт, разведённый до иммуногенности 2,0 МЕ/мл. Референтная сыворотка, используемая в Центрах по борьбе и профилактике болезней, является вторым международным стандартом для иммуноглобулина бешенства (Lyng,1994), который можно получить из Национального института по биологическим стандартам и контролю (см. сноску 2). Референтную сыворотку следует хранить в виде замороженных аликвот в количествах, достаточных для проведения тестов в течение одной недели. В лаборатории следует также готовить и включать в каждый тест положительный сывороточный контрольный стандарт, разведённый до иммуногенности 0,5 МЕ/мл, и отрицательный сывороточный контрольный стандарт с иммуногенностью  $< 0,1$  МЕ/мл.

### **2.2.6. Опытные сыворотки**

Перед тестированием сывороточные образцы следует нагревать при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут с целью инактивации комплемента. Если сыворотки заморожены, то их следует повторно нагреть после оттаивания. Серийные разведения опытных сывороток можно приготовить на восьмилуночных предметных стёклах для культуры ткани. Скрининговые разведения  $1/5$  и  $1/50$  достаточны для рутинной оценки эффективности вакцинации и могут проводиться следующим образом:

- i) Приготовьте разведение  $1/2,5$  путём переноса 0,1 мл инаktivированной сыворотки и 0,15 мл ЕМЕМ-10 на одно из предметных стёкол. Перемешайте путём осторожного покачивания предметного стекла.
- ii) Перенесите 0,05 мл разведения  $1/2,5$  во вторую лунку, содержащую 0,45 мл ЕМЕМ-10. Удалите всё, кроме 0,1 мл, из лунки, содержащей разведение  $1/2,5$ .

- iii) Перемешайте содержимое второй лунки и удалите всё, кроме 0,1 мл.
- iv) Добавьте 0,1 мл препарата контрольного вируса (содержащего 32-100 ФОД<sub>50</sub>) ко всем сывороточным разведениям.
- v) Перемешайте и инкубируйте при 35°C во влажном инкубаторе с 0,5% CO<sub>2</sub> в течение 90 минут.

#### **2.2.7. Добавление клеток**

- i) Во время периода инкубации подвергните трипсинизации исходную культуру 3-5-дневных клеток нейробластомы мышей.
- ii) Ресуспендируйте клетки в ЕМЕМ-10 до получения конечной концентрации  $1 \times 10^5$  клеток на 0,2 мл.
- iii) Поместите 0,2 мл клеточной суспензии в каждую лунку предметного стекла и инкубируйте при 35°C во влажном инкубаторе с 0,5% CO<sub>2</sub> ещё в течение 20 часов.

#### **2.2.8. Фиксация в ацетоне и окрашивание с использованием реакции иммунофлуоресценции**

- i) Через 20 часов удалите предметные стёкла из инкубатора и вылейте среду в вирулицидный раствор.
- ii) Ополосните предметные стёкла один раз в ЗФР, а затем зафиксируйте в течение 10 минут при комнатной температуре в холодном ацетоне (-20°C).
- iii) Перед тем, как добавить конъюгированную с флуоресцеин изотиоцианатом антирабическую сыворотку, оставьте предметные стёкла на 10 минут для высыхания. Конъюгат можно готовить в ЕМЕМ - 10 или ЗФР; нет необходимости адсорбировать конъюгат тканью или клетками. Рабочее разведение конъюгата следует определять путём титрования. Предметные стёкла необходимо

окрашивать в течение 20-30 минут при 37<sup>0</sup>С, а затем ополаскивать в ЗФР и дистиллированной воде, соответственно.

- iv) Предметные стёкла следует изучать под флуоресцентным микроскопом.

### **2.2.9. Вычисление титров вируснейтрализующих антител**

Остаточный вирус обнаруживают с использованием стандартного флуоресцентного микроскопа. Конечный титр сывороточной нейтрализации определяется как фактор наивысшего разведения сыворотки, при котором 50% наблюдаемых микроскопических полей содержат одну или более инфицированных клеток (а именно, 97% сокращение вирусного инокулята). Эту величину можно получить путём математической интерполяции. Альтернативно 100% титр нейтрализации можно получить путём регистрации наивысшего сывороточного разведения, при котором нейтрализуется 100% контрольного инокулята и ни в одном из наблюдаемых полей нет инфицированных клеток. При использовании обоих методов титрования титр антител в опытной сыворотке (в МЕ/мл) можно получить путём сравнения с титром национального референтного стандарта, включённого в каждый тест. Следует отметить, что можно также проводить быструю реакцию подавления флуоресцирующего фокуса с использованием клеток ВНК-21 вместо клеток нейробластомы. Для этого был опубликован модифицированный протокол (ВОЗ, 1996).

Необходимо строго придерживаться следующих параметров:

- Вирус бешенства: может быть использован только штамм CVS-11.
- Культуры клеток: должны использоваться только клетки ВНК-21 (АТСС номер ССL 10) или клетки МNА (АТСС номер ССL 131).
- Тест можно проводить только с использованием предметных стекол Lab-tes.
- Для вируса бешенства, незараженной сыворотки и положительной стандартной собачьей сыворотки должны использоваться контрольные карты.
- Обратная титрация стандарта контрольного вируса (CVS), так же как незараженная сыворотка и положительная стандартная собачья должны быть на контрольном планшете.
- Метод считывания результатов теста: каждое предметное стекло должно иметь 25-50 полей и наблюдаться при  $\times 160$ -2000 увеличении.

- Требуется как минимум 3-5-кратных разведений сыворотки.
- При переводе  $\log D_{50}$  в МЕ/мл можно использовать только величину  $\log D_{50}$  положительной стандартной собачьей сыворотки.

### 2.3. Реакция вируснейтрализации на мышах

МЭБ и ВОЗ больше не рекомендуют постановку данного метода.

### 2.4. Иммуноферментный анализ (тест, предписанный для международной торговли)

ИФА является экспресс методом (примерно 4 часа), при проведении которого не требуется работать с живым вирусом бешенства. Имеются коммерческие наборы не прямой ИФА, позволяющие обнаруживать антитела к вирусу бешенства в отдельных образцах собачьей и кошачьей сыворотки после вакцинации. В 2007г. Международный комитет принял такие методы как предписанные тесты, при условии, что используется тест-набор, который был валидирован и включен в Регистр МЭБ как набор, который соответствует этим особым целям<sup>3</sup> или который полностью валидирован для этой цели, включая сравнение с предписанными методами вируснейтрализации и калибровку по ним.

Другие методы ИФА или другие наборы не должны рассматриваться как предписанные, но могут быть полезными для мониторинга кампаний по вакцинации популяций диких животных, при условии, что используемые наборы были валидированы в отношении исследуемых видов диких животных.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

### 1. Основная информация

Обычно государство осуществляет профилактику и контроль бешенства и во многих странах вакцины могут использоваться только под контролем компетентных органов. Руководство для производства ветеринарных вакцин дано в главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководство, изложенное здесь и в главе 1.1.8, является общим по характеру и может быть дополнено национальными и региональными требованиями. В некоторых странах и регионах в отношении производителей, которые

<sup>3</sup> Смотрите <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests>

хотят получить разрешение или лицензию на производство ветеринарных вакцин применяются требования к качеству, безопасности и эффективности. Там, где возможно, производители должны стараться получить такую лицензию или разрешение на производство собственных вакцин против бешенства с целью независимой верификации качества их продукции.

Вирулентный вирус бешенства может использоваться для производства инактивированных вакцин против бешенства: таким образом, предприятие, производящее вакцину против бешенства должно работать согласно соответствующим процедурам и практикам биобезопасности. Предприятие должно отвечать требованиям безопасности, изложенным в главе 1.1.3 и ВОЗ (2005).

Вакцины против бешенства определяются как стандартизированный препарат, содержащий определенное количество иммуногенов. Эти иммуногены являются как инактивированными (убитыми), живыми-аттенуированными или полученными в результате применения биотехнологии, как описано в главе 1.1.8.

Имеются лицензированные вакцины для парентеральной вакцинации домашних животных и пероральной вакцинации с целью иммунизации диких животных. Эти вакцины часто используются при вакцинации свободно обитающих и обитающих в неволе животных с нарушениями инструкции. Пероральные вакцины для собак находятся на экспериментальном этапе (ВОЗ, 2007).

Лиссавирусы классифицируют по различным видам вируса, как описано в Разделе А данной главы. Все вакцины против бешенства производят из вируса бешенства (Типовые виды RABV).

Большинство вакцин против бешенства готовят из исходного штамма Пастера 1882 и штаммов, полученных из него (вирус Пастера, Стандарт Контрольного Вируса [CVS], Pitman-Moore) и штаммов, изолированных в 20 веке (Flury, кратковременное пассирование на куриных эмбрионах [LEP], долговременное пассирование на куриных эмбрионах [HEP], Street-Alabama-Dufferin [SAD], Внуково) (Geue et al., 2008; Tao et al., 2010; Wu et al., 2011). Вакцины против бешенства, производящиеся в соответствии с требованиями МЭБ защищают от всех вариантов вируса бешенства, включая другую филогруппу лиссавирусов 1 (Broofes et al., 2005).

Таблица 1. Вирусы бешенства, используемые в настоящее время для контроля или производства вакцин (Muller et al., 2009; Pastoret et al., 1997)

Штамм Пастера	Street-Alabama-Dufferin	Штамм Flury	Другие штаммы
---------------	-------------------------	-------------	---------------

<p>1882 Франция у больной бешенством коровы, которая была заражена собакой</p> <p>Пассажи в кроликах и мышах, затем пассажи в клетках на разных уровнях:</p> <p>Вирус Пастера (PV-12)</p> <p>Kissling (CVS-11)</p> <p>Контрольный штамм вируса CVS (CVS-27)</p> <p>Pitman-Moore (PM)</p> <p>RV-97</p>	<p>1935 США у собаки</p> <p>Первичные клетки хомяков и свиней (10 пассажей) = ERA</p> <p>Пассажи клеточной линии ВНК 21:</p> <p>SAD Внуково (СССР Россия)</p> <p>SAD Внуково-32</p> <p>SAD Берн (Швейцария)</p> <p>SAD-B19</p> <p>SAG2</p> <p>ERA 333</p>	<p>1939 США у мисс Flury, которая заразилась от собаки</p> <p>136 пассажей в 1-дневных цыплятах</p> <p>40/50 пассажей в яйцах с развивающимися эмбрионами:</p> <p>кратковременное пассирование на куриных эмбрионах (LEP)</p> <p>220/227 пассажей в яйцах с развивающимися эмбрионами:</p> <p>Долговременное пассирование на куриных эмбрионах (HEP)</p>	<p>СТН: Китай у собаки (1956)</p>
---	---	--	-----------------------------------

Вакцины против вируса бешенства могут не обеспечить адекватной перекрестной защитой против всех лиссавирусов. Например, нет защиты против филогрупп 2 и 3, которые включают вирус Мокола (Von Telchman et al., 1998), вирус Лагос летучих мышей (Markotter et al., 2008), Западно-кавказский вирус летучих мышей (Hanlon et al., 2005) и вирус летучих мышей Шимони (Кузьмин et al., 2010).

Бешенство не является кандидатом для глобального искоренения (Rupprecht et al., 2008). Однако с точки зрения мирового здравоохранения собака должна считаться основной мишенью для уничтожения бешенства, т.к. она является его главным резервуаром. Болезнь можно успешно контролировать у некоторых видов плотоядных, таких как красных лис и енотовидных собак (Cliquet et al., 2012). Помимо собак, другие домашние

животные (такие как кошки, хорьки и т.д.) и домашний скот представляют риск для человека и будет полезным включить их в государственную программу вакцинации. Более того, рекомендуется проводить вакцинацию домашнего скота, т.к. она обеспечивает безопасность во многих частях мира.

Вакцины против бешенства составлены специально для иммунизации домашних или диких животных путем инъекций или пероральным способом введения.

Вакцины против бешенства производят как с использованием яиц, так и клеточных культур. Вакцины на основе нервных тканей, приготовленные на животных, больше не считают безопасными или эффективными для человека (ВОЗ, 2005) и их применение на животных необходимо прекратить.

## **2. Антирабические вакцины для инъекций**

### **2.1. Общие сведения**

Основная причина использования инъекционных антирабических вакцин состоит в защите здоровья человека посредством профилактики и контроля бешенства у животных, особенно у собак. Инъекции гарантируют попадание иммуногена в целевые виды. Вакцинация также используется для защиты видов и домашнего скота, находящихся под угрозой.

Живые-аттенуированные вакцины штамма Flurry (LEP или NEP) или SAD широко использовались для введения инъекций домашним животным. Однако было зарегистрировано, что несколько из этих продуктов вызывали бешенство у вакцинированных животных. Поэтому их использование в виде инъекций должно быть прекращено (Bellinger et al., 1983; Esh et al., 1982; Fehlner-Gardiner et al., 2008).

Антирабические гликопротеиновые векторные вакцины, полученные на основе биотехнологий не являются живыми антирабическими вакцинами (ВОЗ, 1996). Их готовят путем введения кода неинфекционной нуклеиновой кислоты вируса бешенства для гликопротеина вируса ящура в вектор для инъекционных вакцин, такой как авипокс. Все они не содержат живой вирус бешенства; животным, вакцинированным антирабическими гликопротеиновыми вакцинами, не должен быть запрещен доступ в страны, где есть ограничения на ввоз животных, вакцинированных живыми антирабическими вакцинами (Taylor et al., 1991). Однако штамм ERA 333, используемый в Восточной Европе, является живой антирабической вирус-вакциной, экспрессирующей гликопротеин вируса бешенства.

### **2.2. Схема производства и минимальные требования к классическим вакцинам**

### **2.2.1. Характеристики посевного материала**

#### **i) Биологические характеристики**

Любой штамм вируса бешенства, предназначенный для производства вакцин, должен защищать от любого варианта вируса бешенства филогруппы 1. Выбор раскладки вируса (MSVs) в идеале должен основываться на скорости размножения в культуре, урожае вируса, стабильности и антигенном спектре (Wu et al., 2011). Референтные лаборатории МЭБ по бешенству могут предоставить изоляты вируса в качестве возможных кандидатов для разработки вакцин. Записи об источнике вирусной раскладки должны храниться.

Вакцины, полученные посредством применения биотехнологий, готовят в соответствующих неозлокачественных клеточных линиях с использованием вектора, экспрессирующего гликопротеин вируса бешенства.

#### **ii) Критерий качества**

Для приготовления посевного вируса для производства вакцин может быть использована только вирусная раскладка, которая была признана чистой (свободной от посторонних агентов) или иммуногенной. Если вирусная раскладка будет использоваться в качестве живой аттенуированной вакцины, то при инъекционном введении она не должна вызывать клиническую форму бешенства у целевых животных.

#### **iii) Валидация в качестве вакцинного штамма**

Вирусная раскладка должна быть охарактеризована должным образом. Она должна быть чистой и свободной от посторонних агентов в соответствии с главой 1.1.9 *Тесты на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов* и тех, которые находятся в списке соответствующих лицензирующих учреждений.

Эффективность полученной вакцины оценивают посредством исследования каждого целевого вида, который был ранее вакцинирован в соответствии с рекомендациями главы 1.1.8 и Раздела С.2.3.3 данной главы.

### **2.2.2. Метод производства**

#### **i) Процедуры**

##### **а) В клеточных культурах**

Вирус используется с целью заражения суспензии или монослоев созданной клеточной линии. Должно быть доказано, что эта клеточная линия свободна от контаминирующих микроорганизмов (см. главу 1.1.8).

Культуры инфицируют адаптированными к культуре клеток штаммами вируса бешенства и инкубируют при соответствующей температуре в течение определенного периода времени. Так как вирус бешенства обычно не вызывает цитопатический эффект, то с той же самой культуры можно собрать несколько урожаев. Этот материал обрабатывают и используют для составления вакцины. Чтобы получить инактивированную (убитую) вакцину вирус инактивируют посредством добавления инактиванта первого порядка, обычно пропиолактона (BPL) или этиленимина (EI) в виде бинарного этиленимина (BEI). Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с инактивантами. Другие инактиванты, такие как формалин и карболовая кислота использоваться не должны. Инактивант добавляется в вирусную суспензию для того, чтобы получить ранее обозначенную концентрацию. Инактивацию необходимо должным образом валидировать и документировать с тем, чтобы продемонстрировать кинетику инактивации и результаты контролей инактивации. Время обработки инактиванта и температура инактивации должны быть валидированы с точки зрения действительных условий и оборудования, используемого во время промышленного производства.

Инактивированные антирабические вакцины обычно выпускаются в жидком или лиофилизированном виде. Наиболее часто используемую жидкую вакцину готовят путем адсорбции антигена на адьюванте, например, на геле гидроокиси алюминия.

#### ii) Требования к среде и субстратам

Итоговая смесь может включать пеногаситель, краситель феноловый красный (если разрешен в стране, которой нужна вакцина), гидролизат лактальбумина, триптозо-фосфатный бульон, аминокислоты, витамины и буферные соли. Сапонин или другие полисахариды могут добавлять в антирабические вакцины для жвачных в качестве адьюванта. Рекомендуется добавлять консерванты в многодозые флаконы. Перед введением лиофилизированные вакцины необходимо разводить соответствующим разбавителем.

#### а) В клетках

Линии клеток, используемые для производства антирабических вакцин, должны соответствовать главе 1.1.8.

b) В яйцах с развивающимися эмбрионами

Этот метод культивирования используется для производства живых аттенуированных вакцин, которые содержат вариантный штамм Flury низкого пассажа (LEP) или вариантный штамм Flury высокого пассажа (HEP). Их использование должно быть прекращено, как указано в разделе 2.1 выше (Тао et al., 2010; Wachendorfer et al., 1982).

iii) Контроль во время производства

Во время процесса производства перед составлением итоговой смеси тесты проводят в различное время, что позволяет верифицировать постоянство процесса производства в соответствии с главой 1.1.8. Тесты на инфекционность, стерильность и полноту инактивации являются существенными в контроле, осуществляемом во время производства. Составление конечного продукта может быть стандартизировано посредством использования дополнительных тестов для измерения целостности вируса после хранения, массы антигена и содержания гликопротеина.

a) Тестирование полноты инактивации

Полноту инактивации верифицируют с использованием теста на остаточное содержание живого вируса. С этой целью урожай инактивированного вируса инокулируют в такой же тип клеточной культуры, которая используется в производстве вакцины или клеточную культуру, которая, по крайней мере, обладает такой же чувствительностью. Количество используемого урожая инактивированного вируса эквивалентно не менее 25 дозам вакцины. После 4х дневной инкубации с использованием трипсинизированных клеток готовят субкультуру; после инкубации в течение последующих 4х дней культуры исследуют на остаточное количество живого вируса бешенства посредством реакции иммунофлуоресценции. Урожай инактивированного вируса считается соответствующего качества, если живой вирус не обнаружен (Государственная Фармакопея, 2012b)

iv) Тестирование конечной партии/серии продукта

После соединения всех ингредиентов итоговая смесь содержит определенный вакцинный состав. Последним этапом процесса производства партии/серии

является наполнение флаконов итоговой смесью. Эту итоговую партию/серию тестируют описанным ниже образом.

a) Стерильность

Тесты на стерильность и свободу от контаминации можно найти в главе 1.1.9.

b) Безопасность

Пока стабильная безопасность продукта не будет доказана и утверждена в регистрационном досье и пока постоянство процесса производства не будет одобрено в соответствии со стандартными требованиями, указанными в главе 1.1.8, должно проводиться тестирование безопасности партии.

Тестирование безопасности партии/серии конечного продукта проводится с целью обнаружения любых аномальных локальных или систематических побочных реакций. Для того, чтобы выпустить новую вакцину, каждое из, по крайней мере, двух здоровых серонегативных целевых животных инокулируют двойной дозой вакцины рекомендуемым способом. Животных наблюдают, по крайней мере, каждый день в течение 14 дней. Вакцина проходит тесты, если ни у одного из животных не наблюдается побочных реакций и ни одно животное не умирает по причине, связанной с введением вакцины (Европейская Фармокопея, 2012b).

c) Остаточное количество живого вируса.

Тест проводят с использованием пула содержимого пяти контейнеров.

Для вакцин, не содержащих адъювант, для обнаружения остаточных количеств живого вируса проводят соответствующий метод амплификации с использованием такого же типа клеточной культуры, которая используется в производстве вакцины или клеточной культуры, которая, по крайней мере, обладает такой же чувствительностью. Вакцина проходит тест, если живой вирус не был обнаружен.

Что касается вакцин, содержащих адъювант, 0,03 мл пула, который в 5 раз превышает самую маленькую дозу, вводят итрацеребрально в каждую из не менее чем десяти мышам, каждая из которых весит 11-15 г. Чтобы предотвратить влияние любого микробиологического консерванта или адъюванта, перед инъекцией вакцину можно разводить более чем в 10 раз. В этом случае или если вакцинный штамм является патогенным для мышей-сосунков, то тест проводят на 1-4 дневных мышах. Животных наблюдают в течение 21 дня. Если в первые 48 часов умирает более двух животных, то

тест проводят повторно. Вакцина проходит тест, если с 3 по 21 день после введения инъекции, животные не проявляют признаков бешенства и в результате реакции иммунофлуоресценции, проводимой на мозге животных, признаков присутствия вируса бешенства не обнаружено.

d) Иммуногенность партии/серии

Что касается живых аттенуированных вакцин и вакцин, полученных посредством применения биотехнологии, титрация вируса является надежным показателем иммуногенности вакцины, когда между уровнем защиты, которым обеспечивает вакцина в целевых видах, и титрами модифицированной живой вакцины устанавливается связь. Титрация вируса должна выполняться с использованием клеточных культур. Это дает возможность лабораториям действовать в соответствии с положениями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и для других научных целей.

Исследование иммуногенности инактивированных вакцин осуществляется на мышах посредством серологических тестов (Крамер et al., 2010) или контрольного теста (Европейская Фармакопея, 2012b; ВОЗ, 1996). Для инактивированных вирусных вакцин был зарегистрирован тест для идентификации возбудителя *in-vitro* (Stokes et al., 2012).

Нет необходимости проводить тестирование иммуногенности каждой партии/серии производимой вакцины, описанное в Разделе C.2.2.2.iv.d.1 Серологическое исследование и Разделе C.2.2.2.iv.d.2 Контрольный тест, при условии, что, по крайней мере, один из этих тестов проводили на предыдущей партии/серии и эта партия/серия отвечала минимальным требованиям к иммуногенности. В данных обстоятельствах для определения иммуногенности партии/вакцины можно применять альтернативный валидированный метод. Критерии для подтверждения устанавливаются на основании иммуногенности серии/партии вакцины, которая продемонстрировала удовлетворительные результаты при проведении серологических исследований и контрольных тестов, как описано ниже:

1) Серологическое исследование

При проведении серологических исследований опытную вакцину сравнивают со стандартной референтной вакциной посредством подсчета нейтрализующих антирабических вирусспецифических антител в мышинной сыворотке. Опытная вакцина проходит тест, если

она индуцирует больше антител, чем стандартная референтная вакцина. Тест необходимо выполнять следующим образом:

Используют пять мышей по 18-20 г. Каждую мышь вакцинируют подкожно или внутримышечно с использованием 1/5 рекомендуемого объема дозы. Через 14 дней после инъекции отбирают образцы крови. Сыворотку тестируют на антитела к вирусу бешенства с использованием теста FAVN или RFFIT (Европейская Фармакопея, 1012 b).

Вакцина отвечает требованиям, если приблизительный или средний титр антител равен или выше титра, полученного в результате тестирования партии/серии, которая продемонстрировала удовлетворительные результаты (Раздел С.2.2.2.iv.d.2: Контрольный тест).

## 2) Контрольный тест

При проведении контрольного теста опытную вакцину сравнивают с референтной вакциной посредством измерения уровня защиты у мышей. Опытная вакцина проходит тест, если она вызывает большую защиту чем референтная вакцина.

В соответствии с Европейской Фармакопеей в описанном ниже тесте используют модель параллельных линий с, по крайней мере, тремя точками для проверки вакцины, а также референтный препарат.

### i) Отбор и распределение опытных животных

В тестировании должны использоваться здоровые 4х-недельные самки мышей, предпочтительнее весом 18-20 г. из того же выводка. Мышей следует распределить, по крайней мере, на 10 групп по 10 мышей.

### ii) Приготовление контрольной суспензии

Группу мышей инокулируют интрацеребрально CVS штаммом вируса бешенства; Если у мышей проявляются признаки бешенства, то их умерщвляют, извлекают мозг и в подходящем разбавителе готовят гомогенат ткани мозга. Крупные взвешенные частицы отделяют посредством центрифугирования, а супернатант используется в качестве контрольной суспензии. Суспензию в маленьких количествах разливают по ампулам, которые герметично закупоривают и

хранят при температуре  $< -60^{\circ}\text{C}$ . Одну ампулу суспензии оттаивают и осуществляют серийное разведение с использованием подходящего разбавителя. Каждое разведение предназначено для группы мышей и 0,025-0,03 мл разведения, предназначенного для этой группы, вводят в каждую мышь интрацеребрально. Животных наблюдают, по крайней каждый день, в течение 14 дней и регистрируют количество животных каждой группы, демонстрирующих признаки бешенства в течение 5-14 дней. Далее подсчитывают среднюю инфекционную дозу ( $\text{ID}_{50}$ ) неразведенной суспензии.

iii) Определение иммуногенности тестируемой вакцины

Для проведения тестирования готовят, по крайней мере, три серийных разведения вакцины и три подобных разведения референтного препарата. Разведения готовят так, что те, которые содержат наибольшее количество вакцины должны защитить более 50% животных, в которых их вводят, а те, которые содержат наименьшее количество вакцины должны защитить менее 50% животных, в которых их вводят.

Каждое разведение предназначено для разных групп мышей и в каждую мышь внутрибрюшинно вводят 0.5 мл разведения, предназначенного для этой группы. Суспензию контрольного вируса готовят через 14 дней после инъекции, чтобы на основании предварительной титрации в каждых 0,025-0,03 мл она содержала около  $50\text{ID}_{50}$ . Каждой вакцинированной мышь вводят интрацеребрально 0,025-0,03 мл этой суспензии. Готовят три подходящих серийных разведения контрольной суспензии. Контрольная суспензия и три разведения предназначены каждой из четырех групп, состоящих из 10 невакцинированных мышей. В каждую мышь вводят 0,025-0,03 мл суспензии разведения, предназначенного для его группы (Strokes et al., 2012). Животных наблюдают, по крайней мере каждый день в течение 14 дней. Тест считается несостоявшимся, если в течение первых 4х дней после контрольного заражения более двух мышей из любой группы

гибнут. Количество животных каждой группы, демонстрирующих признаки бешенства в течение 5-14 дней, регистрируют.

Результаты теста считаются недействительными за исключением следующих случаев:

- 50% защитная доза тестируемой вакцины и референтного препарата находится между самой маленькой и самой большой дозой, вводимой мышам;
- Титрация контрольной суспензии показывает, что 0,03 мл суспензии содержит от 10 до 50 ID<sub>50</sub>;
- Доверительные пределы ( $p = 0,95$ ) – не менее 25% и не более 400% предполагаемой иммуногенности; если данный критерий применимости не соблюдается, то в наименьшей предписанной дозе низший предел предполагаемой иммуногенности должен равняться примерно 1 ME;
- Статистический анализ демонстрирует значительный уклон ( $p = 0,95$ ) и отсутствие значительных отклонений от линейности или параллелизма кривой реакции на дозу ( $p = 0,99$ ).

Вакцина отвечает требованиям МЭБ, если предполагаемая иммуногенность равна не менее 1 ME в наименьшей предписанной дозе.

iv) Применение альтернативных конечных точек

Если лаборатория начала использование данного теста, то летальную конечную точку заменяют наблюдением за клиническими признаками и применением конечной точки до наступления смерти с целью уменьшения страданий животных. Ниже приводится пример:

Прогрессирование инфекции бешенством у мышей после интрацеребральной инъекции может быть представлено пятью этапами в соответствии с типичными клиническими признаками:

Этап 1: взъерошенная шерсть, сгорбленная спина;

Этап 2: медленные движения, отсутствие концентрации внимания (могут наблюдаться круговые движения);

Этап 3: неуверенные движения, дрожь, конвульсии;

Этап 4: признаки пареза или паралича;

Этап 5: предсмертное состояние

Мышей наблюдают, по крайней мере два раза в день, начиная с 4го дня после контрольного заражения. При каждом наблюдении записывают клинические признаки. Опыт показал, что использование этапа 3 в качестве конечной точки позволяет получить результаты теста, которые являются эквивалентными результатам, полученным при использовании летальной конечной точки. Это должно быть верифицировано каждой лабораторией, которая оценивает соответствующее количество тестов с использованием как клинических признаков, так и летальной контрольной точки.

Тест на иммуногенность Национального Института Здоровья (НИИ тест), как описано в Кодексе Федерального Регулирования США (9CFR), подобен Европейскому тесту, за исключением того, что вторая инъекция вакцины проводится через неделю после первой инъекции. Считывание и подсчет являются идентичными (Европейская фармакопея, 2012а; 9CFR, 2010).

## **2.3 Требования к авторизации/лицензированию/регистрации**

### **2.3.1. Процесс производства**

Для регистрации вакцины вся информация, касающаяся производства вакцины и тестирования контроля качества (См. Раздел С.2.2.1. и С.2.2.2.) должна быть предоставлена в органы управления. Должна быть предоставлена информация по трем следующим друг за другом партиям/сериям вакцин объемом не менее 1/3 типичного промышленного объема партии/серии.

### **2.3.2. Требования к безопасности**

Испытания на безопасность для регистрации инактивированных инъекционных антирабических вакцин идентичны испытаниям, описанным в Раздел С.2.2.2.iv d.1. Их надо проводить в соответствии с VICH<sup>4</sup> Руководство 44, Раздел 2.1.2, как указано здесь.

Что касается вакцин, которыми прививают один раз в жизни, или серий для первичной вакцинации, то нужно применять первичную

---

<sup>4</sup> VICH: Международное Сотрудничество по Гармонизации Технических Требований для Регистрации Ветеринарных продуктов.

схему вакцинации. Что касается вакцин, которыми прививают один раз в жизни, или серии первичной вакцинации с последующей бустерной вакцинацией, то должна применяться схема первичной вакцинации и дополнительная доза. Для удобства рекомендуемые интервалы между введением могут быть сокращены до, по крайней мере, 14 дней. Оценка тестирования одной или повторной дозы должна проводиться с использованием пилотной или производственной партии, имеющей максимальную высвобождаемую иммуногенность или, в случае, если максимальная высвобождаемая иммуногенность, подлежащая лицензированию, не указана, то необходимо использовать обоснованное кратное число минимальной высвобождаемой иммуногенности.

Вообще нужно использовать восемь животных на группу за исключением особых случаев. Что касается каждого целевого вида, то необходимо использовать вакцину в соответствии с наиболее чувствительным классом, возрастом и полом, указанными на этикетке. Необходимо использовать серонегативных животных. В случае, если использование серонегативных животных невозможно, то использование других животных должно быть обосновано.

Если указаны разные способы введения вакцины, то рекомендуется введение всеми способами. Если было доказано, что один способ введения является причиной самых серьезных последствий, то для проведения данного исследования можно использовать этот единственный способ. Особое внимание нужно уделять месту введения, особенно что касается кошек. Необходимо следовать рекомендациям в отношении мест введения.

Вакцины, полученные в результате применения биотехнологий, не распространяют вирулентный вирус бешенства, но существуют другие факторы, связанные с безопасностью (Roses et al., 2012). Особые требования к безопасности вакцин данного вида описаны в Главе 1.1.8 и относятся к вакцинам, полученным посредством применения биотехнологий.

i) Меры предосторожности и опасность

Современные инъекционные антирабические вакцины являются безопасными при условии, если они инактивированы. В них не используется адьювант и они не представляют токсической опасности для вакцинируемых. Что касается адьювантированных вакцин, живых аттенуированных вакцин и вакцин, полученных в результате применения биотехнологий, то производители должны предупреждать о том, что в случае самоинъекции, необходимо обратиться за помощью врачей.

### **2.3.3 Требования к эффективности**

Что касается травоядных, то минимальным требованием является то, что эффективность может быть доказана посредством проведения серологических тестов (Европейская фармакопея, 2012а). У других видов эффективность доказывают при помощи контрольного заражения.

Опытные животные должны быть однородными и не иметь нейтрализующих антител к вирусу бешенства, что определяется при помощи реакции нейтрализации сыворотки, которая является реакцией, предписанной для международной торговли (См. Раздел В данной главы).

Что касается контрольного заражения, то контрольный вирус готовят для того, чтобы определить дозу и метод, которые смогут вызвать клинические признаки бешенства у, по крайней мере, 80% инактивированных контрольных животных. Как только у животных начинают проявляться клинические признаки бешенства, то их умерщвляют и посредством использования диагностических тестов, описанных в Разделе В данной главы, подтверждают бешенство.

Что касается тестирования на эффективность вакцинированных животных, таких как собак, то в качестве вакцинированных животных нужно использовать 25 или более животных. Состав вакцины, используемой для проведения испытания, является минимальным для использования в плановом производстве. В качестве контролей нужно использовать 10 или более дополнительных животных. В конце периода заявленной длительности иммунитета, вакцинированных животных и контрольных животных заражают предустановленной дозой, как было описано выше. После заражения животных наблюдают, по крайней мере, каждый день в течение 90 дней. Как только у животных начинают проявляться клинические признаки бешенства, то их умерщвляют и посредством

использования диагностических тестов подтверждают бешенство. В конце периода наблюдения всех выживших животных умерщвляют и с использованием диагностических тестов, описанных в Разделе В данной главы, проводят исследования их мозга.

Требованиями для одобрения являются следующие условия: гибель из-за бешенства 80% контрольных животных, в то время как 22 из 25 или 26 из 30 или статистически эквивалентное число вакцинированных животных остаются свободными от бешенства в течение 90 дней.

#### **2.3.4 Стабильность**

Как описано в главе 1.1.8

#### **2.3.5. Длительность иммунитета**

В рамках процедуры авторизации от производителя требуется доказать *длительность иммунитета* данной вакцины как посредством контрольного заражения, так и с использованием валидированного альтернативного теста, такого как серологический тест, в конце заявленного периода защиты.

### **3. Антирабические вакцины для перорального использования**

#### **3.1. Обоснование**

Концепция пероральной вакцинации против бешенства развивалась в 1970х годах в результате исследований George Baer в США (Baer et al., 1991), которые продолжил Franz Steck в Швейцарии (Steck et al., 1982). Все вакцины, используемые в настоящее время для пероральной вакцинации, являются или модифицированными живыми вакцинами, или вакцинами, полученными в результате применения биотехнологий. Они сконструированы посредством введения гена гликопротеина вируса бешенства в вирусный вектор. Вирусы оспы (например, коровья оспа) и аденовирусы являются наиболее часто используемыми векторами. Иммунизация проводится посредством введения пероральной вакцины через лимфоидную ткань слизистой оболочки полости рта или ноздри, где экспрессия вирусных белков стимулирует нервную систему. Большинство вакцинных вирусов уничтожается во внутрижелудочной среде вакцинированных животных. Доступность одичавших или диких животных для вакцинации является проблемой, а использование пероральной вакцинации является эффективным решением. При использовании пероральных вакцин огромное внимание необходимо уделять безопасности и здесь речь идет не только о целевых животных, но и окружающей среде, других видах, включая человека, которые могут контактировать с вакциной (см. главу 1.1.8).

Управление ветеринарии и общественного здравоохранения ВОЗ играл важную роль в определении требований к обеспечению безопасности и эффективности пероральных вакцин как для целевых видов, так и не целевых (особенно, людей), которые могут контактировать с летучими мышами или недавно вакцинированными животными (ВОЗ, 1989; 2005; 2007).

### **3.2. Краткое описание процесса производства и минимальные требования к вакцинам**

В дополнение к требованиям, изложенным в главе 1.1.8., необходимо соответствовать следующим особым требованиям.

#### **3.2.1. Характеристика посевного вируса**

Посевной вирус готовят из соответствующего имунногенного штамма высоко аттенуированного вируса бешенства или векторного вируса гликопротеина (G). Должна быть описана история вирусной расплодки, ее имунногенных характеристик, безопасность и отсутствие возврата к вирулентности, включая наличие генетических маркеров для модифицированной живой вакцины. Полная геномная последовательность посевного вируса должна быть представлена регламентирующему органу и помещена в общественную базу данных для верификации идентичности и генетической стабильности. Что касается вирусной расплодки, полученной в результате применения биотехнологии, то необходимо учитывать информацию о рекомбинации т.к. теоретически существует риск возможной генетической передачи и обмена с другими вирусами.

#### **3.2.2. Способ производства**

##### **i) Процедура**

Расплодку используют для инфицирования суспензии или монослоев созданной линии клеток. Должно быть доказано, что эти клеточные культуры нетуморогенны и свободны от контаминирующих микроорганизмов.

##### **ii) Контроль на производстве**

Во время процесса производства перед составлением окончательной смеси в разное время проводят тесты, которые позволяют верифицировать стабильность производства. Тесты

на инфекционность и стерильность являются основными в контроле процесса.

iii) Тестирование итоговой серии/партии продукта

После соединения всех ингредиентов итоговая смесь имеет определенный состав, который используется как в лиофилизованном, так и жидком виде. Последним этапом производства серии/партии является фасовка окончательной смеси в пакетики/капсулы, которые кладут в приманки или помещают ее прямо в ловушку. Данную итоговую серию/партию исследуют с использованием описанных ниже тестов:

A) Стерильность: Тестирование можно проводить до или после помещения в ловушку. Тесты биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминирования описаны в главе 1.1.9.

b) Идентичность: Идентичность иммуногена исследуют с использованием рабической антисыворотки моноспецифичной для гликопротеина G для вакцины, созданной на основе биотехнологий. Что касается модифицированной живой вакцины, то целью тестирования является подтверждение наличия генетического маркера.

c) Чистота партии/серии

Для модифицированной живой вакцины 1 в 10 и 1 в 1000 разведений вакцины инокулируют в восприимчивые культуры клеток. Разведения инкубируют при температуре 37°C. Через 2, 4 и 6 дней клетки окрашивают с использованием панели моноклональных антител, которые не вступают в реакцию с вакцинным штаммом, но вступают в реакцию с другими штаммами антирабической вакцины (например, уличный вирус, штамм Пастера). Вакцина проходит тест, если нет признаков контаминации вирусом бешенства (Европейская Фармакопея, 2012b).

d) Безопасность

Если соответствующая безопасность не будет доказана и подтверждена в регистрационном досье и стабильность процесса производства не будет подтверждена в соответствии с требованиями, изложенными в главе 1.1.8., то тестирование безопасности партии должно проводиться следующим образом: двум здоровым собакам вводят 10 доз пероральным способом и затем их наблюдают в течение 14 дней. Кроме того, 8 мышам внутрибрюшинно или подкожно вводят 0,5 мл дозу. Затем их наблюдают в течение 14 дней. Если у животных проявляются какие-либо побочные реакции, связанные с введением вакцины, то партия/серия считается неудовлетворительной.

е) Иммуногенность партии/серии

Что касается аттенуированных вакцин и вакцин, созданных в результате использования биотехнологий, титрация вируса является надежным показателем иммуногенности вакцин, как только устанавливается взаимосвязь между уровнем защиты, которым вакцина обеспечивает целевых видов, и титрами вакцины. Титрация вируса должна проводиться с использованием культур клеток. Это позволяет лабораториям работать в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей. Иммуногенность вакцин, созданных с использованием биотехнологий может быть определена посредством измерения сероконверсии у вакцинированных животных. У более 80% вакцинированных животных должен вырабатываться титр  $> 0,5$  ME/мл.

### **3.3 Требования к авторизации/регистрации/лицензированию**

#### **3.3.1. Процесс производства**

Чтобы зарегистрировать вакцину вся соответствующая информация, касающаяся производства вакцины и тестирования качества контроля

должна быть предоставлена компетентному органу. Данная информация должна быть получена от трех, следующих друг за другом партий/серий вакцин объемом не менее 1/3 типичного объема партии/серии.

Внутренний контроль является частью процесса производства.

### **3.3.2. Требования к безопасности**

В соответствии с главой 1.1.8. необходимые тесты на безопасность вакцины должны проводиться на каждом виде, для которого она предназначена. Для этого класса вакцин требуется проводить только тестирование на безопасность с целью обнаружения передозировки и возврата к вирулентности.

Тестирование модифицированных живых вакцин на возврат к вирулентности и тестирование на безопасность вакцин, созданных на основе биотехнологий, должно проводиться в соответствии с главой 1.1.8.

#### **i) Модифицированные живые вакцины (МЖВ)**

##### **а) На целевых видах**

Для проведения теста на безопасность с целью обнаружения передозировки десяти молодым животным (дикие животные - моложе 6 месяцев, собаки – 10 недель), свободным от антител бешенства, перорально вводят 10× дозу суспензии вакцины, предпочтительно, с использованием шприца. После введения вакцины необходимо провести оценку возможности выделения вируса со слюной животных посредством неоднократного отбора смывов в течение первого дня после иммунизации и затем ежедневно в течение 7 дней. Любой выделенный вирус должен быть охарактеризован. Животных наблюдают в течение 180 дней. Особое внимание должно быть уделено неврологическим признакам и случаям немедленной гибели, которую необходимо исследовать с использованием тестов, предназначенных для международной торговли (См. Раздел В данной главы).

После проведения исследования необходимо проводить исследование мозга на наличие вакцинного вируса.

Тест является удовлетворительным, если не наблюдается побочных реакций, связанных с введением вакцины, или в мозге не обнаружен вирус. Вирус, выделенный из смывов, должен быть вакцинным штаммом и соответствовать ограниченной репликации вируса с точки зрения времени и количества.

b) В нецелевых видах

Необходимо проводить исследования репрезентативной группы восприимчивых к бешенству видов, которые по всей видимости могут поедать приманки. Необходимо проводить пероральные исследования, по крайней мере, десяти животных каждого вида с использованием полевой дозы вакцины. Их необходимо наблюдать в соответствии со свойственным им инкубационным периодом бешенства.

Поскольку проведение исследований диких животных является трудным и их количество должно быть сведено к минимуму, то рекомендуется проводить дополнительные лабораторные тесты на грызунах. В тестировании должно участвовать не менее 20 грызунов. Их инокулируют перорально вакцинным штаммом эквивалентным одной максимальной пероральной дозе. Такое же количество контактных животных должно участвовать в исследовании передачи вируса. Всех животных необходимо наблюдать в течение, по крайней мере, тридцати дней. Животных, которые умерли по не связанной с бешенством причине, уничтожают.

Исследования на безопасность должны также проводиться на низших приматах.

ii) Вакцины, созданные на основе биотехнологий

a) На целевых видах

Для проведения теста на безопасность с целью обнаружения передозировки десяти молодым животным, свободным от антител бешенства, перорально вводят 10×дозу суспензии вакцины, предпочтительно, с использованием шприца. После введения вакцины необходимо провести оценку возможности выделения вируса со слюной животных посредством неоднократного отбора смывов в течение первого дня после иммунизации и затем ежедневно в течение 7 дней. Любой выделенный вирус должен быть охарактеризован. Животных наблюдают в течение 14 дней.

Тест является удовлетворительным, если не наблюдается побочных реакций, связанных с введением вакцины. Вирус, выделенный из смывов, должен быть вакцинным штаммом и соответствовать ограниченной репликации вируса с точки зрения времени и количества. Что касается вакцины, предназначенной для использования на собаках, отсутствие вируса должно быть доказано через 4 дня после иммунизации.

b) В нецелевых видах

Необходимо проводить исследования репрезентативной группы восприимчивых к вирусному вектору видов, которые по всей видимости могут поедать приманки. Необходимо проводить пероральные исследования, по крайней мере, десяти животных каждого вида с использованием полевой дозы вакцины. Их необходимо наблюдать в соответствии со свойственным им инкубационным периодом бешенства.

Поскольку проведение исследований дикими животными является трудным и их количество должно быть сведено к минимуму, то рекомендуется проводить дополнительные лабораторные тесты на животных, восприимчивых к вирусному вектору. В каждом тесте должно участвовать не менее 20 животных. Их

инокулируют перорально вакцинным штаммом эквивалентным одной максимальной пероральной дозе. Такое же количество контактных животных должно участвовать в исследовании передачи вируса. Всех животных необходимо наблюдать в течение, по крайней мере, 14 дней. Животных, которые умерли по причине болезни, несвязанной с вектором, уничтожают.

Если вирусный вектор является инфекционным для человека, то исследования на безопасность должны проводиться на низших приматах и мышах с ослабленным иммунитетом.

Эта вакцина должна также соответствовать разделу главы 1.1.8. о лицензировании вакцин, созданных на основе биотехнологий (в стадии рассмотрения).

### iii) Меры предосторожности и опасность

Попадание пероральной вакцины в окружающую среду должно соответствовать требованиям, изложенным в главе 1.1.8. Современные пероральные антирабические вакцины безопасны, если они представлены в виде ловушек и не несут токсической опасности для вакцинированных животных. В случае утечки вакцины из разорванных пакетиков, производители должны делать предупреждение о том, что в случае случайного контакта нужно обращаться за медицинской помощью, особенно если был контакт со слизистой оболочкой, кожей или ссадинами.

До того, как начать кампанию по вакцинации необходимо проинформировать представителей управления здравоохранения и провести обучение населения. Особенно это касается того, чтобы не трогать приманки и не контактировать с животными, которые недавно съели ловушку.

ВОЗ отвечает за распространение среди отдельных групп населения информации, касающейся здравоохранения, о риске пероральных вакцин.

### **3.3.3. Требования к эффективности**

Производитель должен доказать эффективность вакцины для каждого вида, для которого она предназначена, посредством использования прямой пероральной инстилляцией на первом этапе и вирулентного вируса в контрольном заражении.

Опытные животные должны быть однородными и не иметь нейтрализующих антител к вирусу бешенства, что определяется при помощи реакции нейтрализации сыворотки, которая является реакцией, предписанной для международной торговли (См. Раздел В данной главы).

Что касается контрольного заражения, то контрольный вирус готовят для того, чтобы определить дозу и метод, которые смогут вызвать клинические признаки бешенства у, по крайней мере, 80% инактивированных контрольных животных. Как только у животных начинают проявляться клинические признаки бешенства, то их умерщвляют и посредством использования диагностических тестов, описанных в Разделе В данной главы, подтверждают бешенство.

Что касается тестирования вакцинированных животных, то в качестве вакцинированных животных нужно использовать 25 или более животных. Титр вакцинного вируса, используемый для тестирования на эффективность, определяет минимальную иммунизирующую инфекционную дозу. Объем не должен превышать объем, который входит в ловушку. В качестве контролей нужно использовать 10 или более дополнительных животных. Через 30 дней вакцинированных животных и контрольных животных заражают предустановленной дозой, как было описано выше. После заражения животных наблюдают, по крайней мере, каждый день в течение 90 дней. Как только у животных начинают проявляться клинические признаки бешенства, то их умерщвляют и посредством использования диагностических тестов подтверждают бешенство. В конце периода наблюдения всех выживших животных умерщвляют и с использованием диагностических тестов, описанных в Разделе В данной главы, проводят исследования их мозга.

Требованиями для одобрения являются следующие условия: гибель из-за бешенства 80% контрольных животных, в то время как 22 из 25

или 26 из 30 или статистически эквивалентное число вакцинированных животных остаются свободными от бешенства в течение 90 дней.

На втором этапе исследования на эффективность должны проводиться с использованием пероральной вакцины и приманок, готовых к использованию в полевых условиях. Вакцина должна иметь минимальный титр, равный, по крайней мере, десяти защитным дозам, полученным с использованием той же самой вакцины в экспериментальных условиях путем прямой пероральной инстилляцией (Blancou et.al, 1986).

Статус защиты можно проверить только посредством проведения серологических исследований: необходимо проведение контрольного заражения вирулентным вирусом бешенства. Применяются те же самые условия и требования для контрольного заражения, за исключением того, что контрольный вирус будут вводить через 180 дней после вакцинации вместо 30 дней.

Если у одного вида была установлена минимальная иммунизирующая доза, то исследования дополнительных видов на эффективность могут ограничиваться исследованиями с использованием приманок. Приманки являются составляющей частью продукта и они должны полностью соответствовать следующим критериям:

- Они должны предназначаться для целевых видов, а также они должны быть приспособлены для способа их распределения по территории. Они не должны привлекать человека.
- Они должны сохранять вид и форму при разных показателях температуры и в разных погодных условиях.
- Они должны позволять включение маркера, как критическое, так и систематическое.
- Ингредиенты должны быть безопасными, соответствовать нормам, применяемым в отношении кормов для животных, и не должны воздействовать на активность вакцины.
- Они должны иметь маркировку с предупредительными обозначениями для людей и идентификацией продукта.

#### **2.3.4. Стабильность**

Минимум пять образцов конечного, готового к использованию продукта инкубируют в течение 5 дней при температуре 25°C. Вакцину титруют три раза. Средний титр вируса должен быть равен, по крайней мере, минимальному вирусному титру, указанному на маркировке, или титру, утвержденному на конец срока хранения. Приманку нагревают при температуре 40°C в течение 1 часа. Оболочка приманки проходит тест, если она сохраняет исходную форму и прикрепляется к контейнеру с вакциной.

#### СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

BADRANE H., BAHLOUL C., PERRIN P. & TORDO N. (2001). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J. Virol.*, 75, 3268–3276.

BAER G.M. (1991). *The Natural History of Rabies*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 620 pp.

BARRAT J. (1992). Experimental Diagnosis of Rabies. Adaptations to Field and Tropical Conditions. Proceedings of the International Conference on Epidemiology, Control and Prevention of Rabies in Eastern and Southern Africa. Lusaka, Zambia, 2–5 June 1992, 72–83.

BARRAT J. & AUBERT M.F.A. (1995). Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. *Revue Méd. Vét.*, 146, 561–566.

BARRAT J. & BLANCOU J. (1988). Technique simplifiée de prélèvement, de conditionnement et d'expédition de matière cérébrale pour le diagnostic de rage. *Doc. WHO/Rab. Res./88.27*.

BELLINGER D.A., CHANG J., BUNN T.O., PICK J.R., MURPHY M. & RAHIJA R. (1983). Rabies induced in a cat by highegg-passage Flury strain vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 183, 997–998.

BINGHAM J. & VAN DER MERWE M. (2002). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods*, 101, 85–94.

BLANCOU J., SCHNEIDER L.G., WANDELER A. & PASTORET P.P. (1986). Vaccination du renard roux (*Vulpes vulpes*) contre la rage par voie orale. Bilan d'essais en station expérimentale. *Rev. Ecol. (Terre Vie)*, 40, 249–255.

BOURHY H., KISSI B. & TORDO N. (1993). Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, 194, 70–81.

BROOKES S.M., PARSONS G., JOHNSON N., MCELHINNEY L.M. & FOOKS A.R. (2005). Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses. *Vaccine*, 23, 4101–4109.

CLIQUET F., AUBERT M. & SAGNE L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*, 212, 79–87.

CLIQUET F., ROBARDET E., MUST K., LAINE M., PEIK K., PICARD-MEYER E., GUIOT A.L. & NIIN E. (2012). Eliminating rabies in Estonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6 (2):e1535. doi: 10.1371/journal.pntd.0001535. Epub 2012 Feb 28.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (9CFR) (2010). Rabies Vaccine, Killed Virus, 9 CFR 113.209. ESH J.B., CUNNINGHAM J.G. & WIKTOR T.J. (1982). Vaccine-induced rabies in four cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 180, 1336–1339.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0. (2012a). Monograph 0451: Rabies vaccine (live, oral) for foxes. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0. (2012b). Monograph 0723: Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.

FEHLNER-GARDINER C., NADIN-DAVIS S., ARMSTRONG J., MULDOON F., BACHMANN P. & WANDELER A. (2008). Era vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J. Wildl. Dis.*, 44 (1), 71–85.

FOOKS A.R., JOHNSON N., FREULING C.M., WAKELEY P.R., BANYARD A.C., MCELHINNEY L.M., MARSTON D.A., DASTJERDI A., WRIGHT E., WEISS R.A. & MULLER T. (2009). Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3, e530.

GEUE L., SCHARES S., SCHNICK C., KLIEMT J., BECKERT A., FREULING C., CONRATHS F.J., HOFFMANN B., ZANONI R., MARSTON D., MCELHINNEY L., JOHNSON N., FOOKS A.R., TORDO N. & MÜLLER T. (2008). Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife. *Vaccine*, 26, 3227–3235.

HANLON C.A., KUZMIN I.V., BLANTON J.D., WELDON W.C., MANANGAN J.S. & RUPPRECHT C.E. (2005). Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.*, 111, 44–54.

HOOPER D.C., MORIMOTO K., BETTE M., Weihe E., Koprowski H. & Dietzschold B. (1998). Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J. Virol.*, 72, 3711–3719.

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES):  
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>

KANG B., OH J., LEE C., PARK B.K., PARK Y., HONG K., LEE K., CHO B. & SONG D. (2007). Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. *J. Virol. Methods*, 145, 30–36.

- KRÄMER B., BRUCKNER L., DAAS A. & MILNE C. (2010). Collaborative study for validation of a serological potency assay for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. *Pharmeur. Bio. Sci. Notes*, 2, 37–55.
- KUZMIN I.V., MAYER A.E., NIEZGODA M, MARKOTTER W., AGWANDA B., BREIMAN R.F. & RUPPRECHT C.E. (2010). Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. *Virus Res.*, 149, 197–210.
- LEMBO T., NIEZGODA M., VELASCO-VILLA A., CLEAVELAND S., ERNEST E. & RUPPRECHT C.E. (2006). Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg. Infect. Dis.*, 12 (2), 310–313.
- LYNG J. (1994). Calibration of a replacement preparation for the international standard for rabies immunoglobulin. *Biologicals*, 22 (3), 249–255.
- MARKOTTER W., KUZMIN I., RUPPRECHT C.E. & NEL L.H. (2008). Phylogeny of Lagos bat virus: challenges for lyssavirus taxonomy. *Virus Res.*, 135, 10–21.
- MONTANO HIROSE J.A., BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. *Vet. Rec.*, 129, 291–292.
- MÜLLER T., BÄTZA, H.-J., BECKERT A., BUNZENTHAL C., COX J.H., FREULING C., FOOKS A.R., FROST J., GEUE L., HOEFLECHNER A., MARSTON D., NEUBERT A., NEUBERT L., REVILLA-FERNÁNDEZ S., VANEK E., VOS A., WODAK E., ZIMMER K. & METTENLEITER T.C. (2009). Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch. Virol.*, 154 (7), 1081–1091.
- PASTORET P.P., BROCHIER A., AGUILAR-SETIÉN A. & BLANCOU J. (1997). Chapter 18 Examples of vaccination, Part 2: Vaccination against rabies. In: *Veterinary Vaccinology*, Pastoret, P.-P., Blancou J., Vannier P. & Verschuere, eds. Elsevier Science, BV, Amsterdam, the Netherlands, pp 616–628.
- PICARD-MEYER E., BARRAT J. & CLIQUET F. (2007). Use of filter paper (FTA) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *J. Virol. Methods*, 140, 174–182.
- ROESS A.A., REA N., LEDERMAN E., DATO V., CHIPMAN R., SLATE D., REYNOLDS M.G., DAMON I.K. & RUPPRECHT C.E. (2012). National surveillance for human and pet contact with oral rabies vaccine baits, 2001–2009. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 240, 163–168.
- RUDD R.J. & TRIMACHI C.V. (1989). Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2522–2528.
- RUPPRECHT C.E., BARRETT J., BRIGGS D., CLIQUET F., FOOKS A.R., LUMBERTDACHA B., MESLIN F.X., MÜLER T., NEL L.H., SCHNEIDER C., TORDO N. & WANDELER A.I. (2008). Can rabies be eradicated? *Dev. Biol. (Basel)*, 131, 95–121.
- SERVAT A., FEYSSAGUET M., BLANCHARD I., MORIZE J.L., SCHEREFFER J.L., BOUÉ F. & CLIQUET F. (2007). A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J. Immunol. Methods*, 318, 1–10.

- SMITH J.S., YAGER P.A. & BAER G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO*, 48, 535–541.
- STECK F., WANDELER A.I., BICHSEL P., CAPT S. & SCHNEIDER L. (1982). Oral immunisation of foxes against rabies: a field study. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B* 29, 372–396.
- STOKES W., MCFARLAND R., KULPA-EDDY J., GATEWOOD D., LEVIS R., HALDER M., PULLE G., KOJIMA H., CASEY W., GAYDAMAKA A., MILLER T., BROWN K., LEWIS C., CHAPSAL J.M., BRUCKNER L., GAIROLA S., KAMPHUIS E., RUPPRECHT C.E., WUNDERLI P., MCELHINNEY L., DE MATTIA F., GAMOH K., HILL R., REED D., DOELLING V., JOHNSON N., ALLEN D., RINCKEL L. & JONES B. (2012). Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward. *Biologicals*, 40, 369–381.
- TAO L., GE J., WANG X., ZHAI H., HUA T., ZHAO B., KONG D., YANG C., CHEN H. & BU Z. (2010). Molecular basis of neurovirulence of flury rabies virus vaccine strains: importance of the polymerase and the glycoprotein R333Q mutation. *J. Virol.*, 84, 8926–8936.
- TAYLOR J., TRIMARCHI C., WEINBERG R., LANGUET B., GUILLEMIN F., DESMETTRE P. & PAOLETTI E. (1991). Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine*, 9, 190–193.
- VON TEICHMAN B.F., DE KOKER W.C., BOSCH S.J., BISHOP G.C., MERIDITH C.D. & BINGHAM J. (1998). Mokola virus infection: description of recent South African cases and a review of the virus epidemiology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 69, 169–171.
- WACHENDÖRFER G., KIEFERT C. & FROST J.W. (1982). Safety tests with Flury HEP strain 675 in wild-living European mammals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 5 (1–3), 177–180.
- WARNER C.K., WHITFIELD S.G., FEKADU M. & HO H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome in situ in formalin-fixed tissues. *J. Virol. Methods*, 67, 5–12.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989). Report of WHO Consultation on requirements and criteria for field trials on oral rabies vaccination of dogs and wild carnivores, Geneva, 1–2 March 1989, Doc. WHO/Rab.Res./89.32.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1985). World Health Organisation Expert Committee on Biological Standards, Thirty-Fifth Report; WHO Technical Report Series No. 725. WHO, Geneva, Switzerland.
- WORLD HEALTH ORGANISATION (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). World Health Organisation Expert Committee on Rabies, Eighth Report; WHO Technical Report Series, 931. WHO, Geneva, Switzerland, 1–87.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007). Oral Vaccination of Dogs against Rabies. WHO, Geneva, Switzerland. WU X., SMITH T.G. & RUPPRECHT C.E. (2011). From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. *Exp. Rev. Vaccines*, 10, 1597–1608.

XU G., WEBER P., HU Q., XUE H., AUDRY L., LI C., WU J. & BOURHY H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals*, 35, 297–302.

**NB:** Референтные лаборатории МЭБ по бешенству

(Новый список МЭБ можно увидеть в Таблице в Части 4 данного Мануала по наземным животным или на веб-сайте МЭБ:

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> ).

Для получения дальнейшей информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах против бешенства свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ.

