

Примечание: Версия утверждена Всемирной Ассамблеей Делегатов МЭБ в мае 2015 года

ГЛАВА 3.1.23.

ВЕЗИКУЛЯРНЫЙ СТОМАТИТ

РЕЗЮМЕ

Везикулярный стоматит (ВС) – это везикулярная болезнь лошадей, крупного рогатого скота и свиней, вызываемая везикуловирусами семейства Rhabdoviridae. Эта болезнь клинически неотличима у релевантных восприимчивых видов от ящура, везикулярной экзантемы свиней (ВЭС) или везикулярной болезни свиней (ВБС). Инфицироваться могут овцы, козы и многие другие виды диких животных. Люди также восприимчивы к болезни. Распространение болезни ограничивается американским континентом, однако, ранее она была описана во Франции и Южной Африке.

Вирус передается непосредственно через кожу или слизистые оболочки, и он был выделен от гнусов и москитов. Была продемонстрирована экспериментальная передача от мошек и свиньям, и крупному рогатому скоту. Имеют место сезонные вариации в распространении везикулярного стоматита: он исчезает в конце сезона дождей в тропических районах и с наступлением первых заморозков в зонах умеренного климата. Патогенез болезни неясен и имели место наблюдения, что специфические циркулирующие антитела не всегда предупреждают инфекцию вирусами серогруппы везикулярного стоматита.

Хотя везикулярный стоматит может подозреваться в случае вовлечения лошадей, а также свиней и крупного рогатого скота, важно проводить срочную дифференциальную диагностику, так как клинические признаки везикулярного стоматита неотличимы от ящура в случае поражения КРС и свиней и от везикулярной болезни свиней или везикулярной экзантемы свиней в случае поражения только свиней.

Идентификация агента: *Вирус может быть легко выделен путем заражения прививкой нескольких систем культуры ткани или куриных яиц с развивающимся эмбрионом. Вирусная РНК может быть обнаружена в эпителиальной ткани и везикулярной жидкости при использовании традиционной и в реальном времени полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Вирусный антиген может быть идентифицирован с помощью непрямого сэндвич твердофазного иммуноферментного анализа (IS-ELISA), который представляет наименее дорогой и наиболее быстрый тест. Хорошей альтернативой является также реакция связывания комплемента (РСК). Может применяться реакция вируснейтрализации (ВН), но она является трудоемкой и занимает много времени.*

Серологические тесты: *Перенесшие болезнь животные вырабатывают серотип-специфические антитела в течение 4-8 дней инфекции, наличие которых подтверждает жидкофазный блокирующий ИФА (LP-ELISA), конкурентный ИФА (C-ELISA) и ВН. Другими описанными тестами являются РСК, иммунодиффузия в агаровом геле и противоточный иммуноэлектрофорез.*

Требования к вакцинам: *Инактивированные вирусные вакцины с гидроокисью алюминия или маслом в качестве адъювантов были протестированы в Соединенных Штатах Америки и в Колумбии, соответственно. Обе вакцины вырабатывали высокие уровни специфических антител в сыворотках вакцинированного КРС. Однако до сих пор пока неясно предупреждают ли сывороточные антитела болезнь. В полевых условиях была использована с неизвестной эффективностью аттенуированная вирусная вакцина.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Везикулярный стоматит (ВС) был описан в Соединенных Штатах Америки (США) Oltsky *et al.* (1926 год) и Cotton (1927 год) как везикулярная болезнь лошадей, а впоследствии КРС и свиней. В результате воздействия вируса возникают везикулы на языке, губах, слизистых оболочках щек, сосках и эпителии копытного венчика у КРС, лошадей, свиней и многих других видов домашних и диких животных. Естественная болезнь у овец и коз случается редко, хотя оба вида могут заражаться в результате экспериментального инфицирования. Смешанные инфекции вирусами ящура и везикулярного стоматита имели место в одних и тех же стадах КРС, и они могут индуцироваться экспериментально. Многие виды лабораторных животных также восприимчивы. Болезнь ограничена американским континентом; однако, она была описана во Франции (1915 и 1917 г.г.) и в Южной Африке (1886 и 1897 г.г.) (Hanson, 1952).

Схожие с гриппом признаки, обычно без везикул, наблюдали у людей, которые контактировали с животными, зараженными везикулярным стоматитом, или которые осуществляли манипуляции с инфекционным вирусом. Все манипуляции с вирусом, включая зараженные материалы от животных, должны проводиться с использованием соответствующих процедур биобезопасности.

Признаны два различных иммунологических серотипа вируса везикулярного стоматита (ВВС): Нью-Джерси (NJ) и Индиана (IND). Оба вируса являются членами рода *Vesiculovirus*, семейства *Rhabdoviridae* и были подробно изучены на молекулярном уровне. В течение последних десятилетий от больных животных были выделены несколько других близкородственных рабдовирусов. Существует три подтипа серотипа IND, исходя из серологического родства: IND-1, IND-2 и IND-3; они также известны как классический IND-вирус (VSIV), вирус Кокал (COCC) и вирус Алагоас (VSAV), соответственно (Federer *et al.*, 1967). Штаммы серотипа NJ и подтипа IND-1 являются эндемичными среди сельскохозяйственного скота в районах на юге Мексики, Центральной Америки, Венесуэлы, Колумбии, Эквадора и Перу, а подавляющее большинство клинических случаев (>80%) вызывает вирус везикулярного стоматита серотипа NJ. Имели место сообщения о спорадической активности вируса везикулярного стоматита серотипа NJ и подтипа IND-1 на севере Мексики и в западной части Соединенных Штатов. IND-2 был выделен только в Аргентине и Бразилии и только у лошадей (Сальта-Аргентина/63, Майпу-Аргентина/86, Раншария-Бразилия/66, Рибейран-Бразилия/79) (Alonso *et al.*, 1991; Alonso Fernandez & Sondahl, 1985). У КРС, содержащегося вместе с зараженными лошадьми, не вырабатывались антитела против вируса везикулярного стоматита (Alonso *et al.*, 1991). Подтип IND-3 (Алагоас-Бразилия/64) идентифицировали спорадически до 1977 года только в Бразилии и только у лошадей. Однако в 1977 году подтип IND-3 (штамм Эспиноза-Бразилия/77) был впервые выделен у КРС в Бразилии; судя по наблюдениям, этот подтип поражает КРС в меньшей степени, нежели лошадей (Alonso *et al.*, 1991; Alonso Fernandez & Sondahl, 1985). Этот вывод подтверждают первые описания в 1926 и 1927 г.г. (Cotton, 1927; Oltsky *et al.*, 1926) серотипов NJ и IND у лошадей, а впоследствии у КРС и свиней; то же самое наблюдали во время других вспышек везикулярного стоматита.

Механизм передачи вируса неизвестен. Вирусы были выделены у гнусов, москитов и других насекомых (Comer *et al.*, 1992; Francu *et al.*, 1988; Mason, 1978). Экспериментальная передача вируса ВС серотипа NJ продемонстрировала распространение от мошек (*Simulium vittatum*) на домашних свиней и КРС (Mead *et al.*, 2004; 2009). Во время эпизоотии 1982 года в западной части США наблюдался ряд случаев прямой передачи от животного животному (Sellers & Maarouf, 1990). Вирус ВС

исторически считался эндемичным у диких свиней на острове Оссабо, штат Джорджия, США (Boring & Smith, 1962), но последние данные допускают, что он, возможно, исчез с острова (Killmaster *et al.*, 2011).

Инцидентность болезни может широко варьировать среди пораженных стад. Обычно 10-15% животных демонстрируют клинические признаки. Клинические случаи в основном наблюдают у взрослых животных. КРС и лошади в возрасте до 1 года поражаются редко. Уровень смертности близок к нулю у обоих видов. Однако наблюдались высокие уровни смертности у свиней, зараженных вирусом NJ. Заболевшие животные выздоравливали приблизительно в течение 2 недель. Самыми широко распространенными осложнениями экономической важности являются мастит и снижение продуктивности в молочных стадах (Lauerman *et al.*, 1962). Последние, вызванные вирусом ВС вспышки в США ассоциировались, главным образом, с лошадьми и серотипом NJ.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Везикулярный стоматит (ВС) нельзя достоверно дифференцировать с клинической точки зрения от других везикулярных болезней у соответствующих восприимчивых видов, таких как ящур, везикулярная экзантема свиней (ВЭС) и везикулярная болезнь свиней (ВБС). Вопросом срочности, поэтому, является ранняя лабораторная диагностика каждого случая подозрения на ВС.

Отбор проб и применяемая для диагностики ВС технология должны быть в соответствии с методологией, используемой для диагностики ящура (глава 2.1.8), ВЭС и ВБС, в целях облегчения дифференциальной диагностики этих везикулярных болезней. Примечание: Вирусы серогруппы ВС могут быть человеческими патогенами и, поэтому, следует принимать соответствующие меры предосторожности при работе с потенциально инфицированными тканями или вирусом (см. Главу 1.1.3 *Биобезопасность и биозащита: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещении для содержания животных*).

Самыми лучшими диагностическими пробами являются везикулярная жидкость, покрывающий неразорвавшиеся везикулы эпителий, эпителиальные лоскуты только что разорвавшихся везикул или мазки с разорвавшихся везикул. Данные пробы могут отбираться с поражений в ротовой полости, а также на конечностях или любых других участках, где идет образование везикул. Рекомендуется перед отбором проб вводить животным седативные препараты с тем, чтобы избежать травм у помощников, и по причинам обеспечения благополучия животных. Пробы от всех видов животных следует помещать в контейнеры с Трис-забуференным триптозным бульоном с феноловым красным, рН 7,6. Если для обнаружения антигена проводится реакция связывания комплемента (РСК), то пробы от всех видов животных следует отбирать в глицерин/фосфатный буфер, рН 7,2-7,6. (Примечание: Глицерин токсичен для клеточных культур и снижает чувствительность выделения вируса; поэтому он рекомендуется только для отбора проб в целях проведения РСК). Пробы следует направлять в лабораторию на пакетах со льдом, если они могут прибыть в лабораторию в течение 48 часов после отбора. Если пробам требуется более 48 часов транзитного времени, их следует отправлять в замороженном виде на сухом льду, принимая меры предосторожности для защиты пробы от контакта с СО₂. Существуют специальные требования к упаковке для отправки проб с сухим льдом (см. Главу 1.1.2 *Отбор, отправка и хранение диагностических проб*, для получения дополнительной информации об отправке диагностических проб). Альтернативным образом пробы можно отправлять с имеющимися в продаже морозильными тароупаковочными материалами, которые были заморожены в

морозильной камере со сверхнизкими температурами (-60°C или ниже), если продолжительность доставки небольшая.

Если от КРС невозможно получить эпителиальную ткань, тогда можно отбирать пищеводно-глоточную жидкость с помощью пищеводно-глоточного (слюнного) зонда. У свиней глоточные пробы можно отбирать для подачи в лабораторию в целях выделения вируса. Данный материал следует направлять в лабораторию в охлажденном виде в Трис-забуференном триптозном бульоне. Если предполагается, что пробы будут в пути более 48 часов после отбора, тогда их следует отправлять в замороженном виде с сухим льдом, как описывалось ранее. Пробы пищеводно-глоточной жидкости для выделения вируса не следует обрабатывать такими растворителями как хлороформ. Вирус можно выделять из оральных или назальных проб в течение 7 дней после заражения.

Если нет возможности отобрать пробы для идентификации агента, тогда можно использовать сывороточные пробы для обнаружения и количественного определения специфических антител. Парные сыворотки от тех же самых животных, отобранные с интервалом в 1-2 недели, могут потребоваться в зависимости от используемого серологического анализа и предшествующей истории вируса ВС в стране.

Специфические реагенты для диагностики ВС недоступны для приобретения, и каждая лаборатория должна производить свои собственные или получать из референтной лаборатории. Две референтные лаборатории МЭБ по везикулярному стоматиту (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*) и Институт здоровья животных в Пербрайте, СК¹, производят и распространяют диагностические реагенты по запросу.

Таблица 1. Методы тестирования, используемые для диагностики везикулярного стоматита, и их назначение

Метод	Назначение					
	Отсутствие циркуляции вируса в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации***
Идентификация агента²						
Выделение вируса*	-	+	-	+++	-	-
IS-ELISA*	-	+	-	+++	-	-
CFT*	-	+	-	++	-	-
RT-PCR*	-	+	-	++	-	-
Обнаружение иммунного ответа³						
LP-ELISA**	++	+++	+++	+++	++	++
C-ELISA**	+++	+++	++	-	+++	++
VN**	++	+++	+++	+++	++	+++
CFT**	-	+	+	+++	+	-

Обозначение: *** = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы существенно ограничивают его применение; - = не подходит для этой цели.

Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные как категория +++ или ++, прошли официальную валидацию, их обычная природа и тот факт, что они широко использовались без сомнительных результатов, делают их приемлемыми.

IS-ELISA = не прямой сэндвич иммуноферментный анализ, CFT = реакция связывания комплемента,

RT-PCR = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, LP-ELISA = жидкофазный блокирующий иммуноферментный анализ, C-ELISA = конкурентный иммуноферментный анализ, VN = реакция вируснейтрализации

* Следует применять только на животных, демонстрирующих клинические признаки, характерные для заражения вирусом ВС. Отрицательный результат может означать, что животные больше не выделяют вирус, уровень вируса слишком мал для обнаружения или, что касается проб для выделения вируса, то пробы не поддерживались при соответствующих температурах и не были получены в соответствующий период времени после отбора для выделения вируса (вирус инактивированный). ** Присутствие антител к вирусу ВС только указывает на предшествующее подвержение воздействию со стороны вируса ВС. Он не устанавливает, выработались ли антитела на текущую инфекцию или прошлую инфекцию. Интерпретация результатов должна базироваться на серологических результатах, клинических проявлениях и эпизоотологии. По результатам РСК антитела обычно присутствуют менее 1 года. Антитела, обнаруживаемые с использованием реакции вируснейтрализации и конкурентного ИФА, могут определяться в течение нескольких лет после заражения. Разница в чувствительности серологических анализов оказывает влияние на обнаружение во время острой фазы заражения; поэтому, если животное демонстрирует острые клинические признаки заражения вирусом ВС, необходимо использовать комбинированное тестирование с применением конкурентного ИФА и РСК или парного отбора проб, показывающих четырехкратное изменение титров (CF, VN, LP-ELISA). *** указывает только на присутствие антител, не указывает на защиту от инфекции.

1 Институт в Пербрайте, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 ONF, Соединенное Королевство

2 Рекомендуется комбинация методов идентификации агента, используемая для той же клинической пробы.

3 Достаточен один из перечисленных серологических тестов

1. Идентификация агента

1.1. Прямая визуализация

Из-за различных морфологических характеристик рабдовируса (вирусы серогруппы ВС), пикорнавируса (вирус ящура и вирус ВБС), калицивируса (ВЭС) и большого количества вирусных частиц, присутствующих в везикулярных жидкостях и эпителиальных тканях, электронная микроскопия может стать полезным диагностическим инструментом для дифференциации рассматриваемого вирусного семейства.

1.2. Культивирование *in-vitro*

Для идентификации вирусов ВС и дифференциальной диагностики везикулярных болезней осветленные суспензии полевых проб, подозреваемых в содержании вируса, следует представлять на тестирование. Для выделения вируса пробы инокулируют в соответствующие клеточные культуры. Прививка культур клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero), почки хомячка (ВНК-21) и IB-RS-2 одной и той же пробой позволяет дифференцировать везикулярные болезни: вирусы ВС вызывают цитопатогенное действие (ЦПД) во всех трех клеточных линиях; вирус ящура вызывает ЦПД в линиях клеток ВНК-21 и IB-RS-2, тогда как вирус ВБС вызывает ЦПД только в линии клеток IB-RS-2. К вирусам серогруппы ВС чувствительны многие другие клеточные линии, а также большинство первичных клеточных культур животного происхождения.

Если ЦПД развивается в культурах, то предпочитаемыми иммунологическими методами для идентификации вирусных антигенов в лаборатории являются ИФА (Alonso *et al.*, 1991; Ferris & Donaldson, 1988), РСК (Alonso *et al.*, 1991; Jenny *et al.*, 1958) и окрашивание флюоресцирующими антителами. Реакция вируснейтрализации (ВН) с известными положительными антисыворотками против вируса ВС серотипов NJ и IND может применяться на тканевых культурах или яйцах с развивающимся эмбрионом, но она требует гораздо больше времени.

1.3. Тестирование *in-vivo*

Вирус реплицируется и может выделяться в 8-10-дневных куриных эмбрионах путем инокуляции в аллатоисный мешок.

1.4. Выделение вируса

1.4.1. Процедура тестирования

- i) Клеточную культуру в пробирках Лейтона и 25 см² флаконах прививают осветленной суспензией тканей или везикулярной жидкостью.
- ii) Инокулированные клеточные культуры инкубируют при 37°C в течение 1 часа.
- iii) Инокулум удаляют и клеточные культуры промывают три раза клеточной культуральной средой и заменяют клеточной культуральной средой, содержащей 2,5% фетальную бычью сыворотку (ФБС).
- iv) Клеточные культуры в пробирках Лейтона инкубируют при 33-35°C и наблюдают за развитием ЦПД.
- v) Через 18-24 часа инкубации покровное стекло с одной пробирки Лейтона с культурой из расчета на инокулированную пробу окрашивают специфическим для вируса ВС серотипов Нью-Джерси и Индиана конъюгатом флуоресцирующих антител (ФА).
- vi) Оставшиеся в пробирках Лейтона культуры и культуры в 25 см² флаконах инкубируют при 35-37°C в течение еще 6 дней и наблюдают ежедневно за развитием ЦПД.
- vii) Через 7 дней после прививки покровные стекла с оставшихся пробирок Лейтона окрашивают конъюгатом ФА.
- viii) Если наблюдают ЦПД, а ФА окрашивание негативное, проводят второй пассаж, как описано выше, с использованием клеток из 25 см² флакона. Примечание: Культуры первого пассажа со значительным ЦПД могут давать ложно-отрицательные результаты иммунофлуоресценции. Можно приготовить серийные десятикратные разведения и инокулировать для обеспечения отдельных блюшек флуоресцирующих клеток.
- ix) *Интерпретация результатов:* Если в культуре во флаконе отсутствует флуоресценция и нет выраженного ЦПД, пробу считают отрицательной в отношении выделения вируса. Если наблюдают специфическую флуоресценцию, тогда проба является положительной в отношении выделения вируса.
- x) Альтернативно клеточную культуру во флаконах можно инокулировать полевыми пробами, инкубировать при 35-37°C в течение 48 часов и наблюдать ежедневно за ЦПД. Если ЦПД не наблюдают в течение 48 часов, культуры во флаконах замораживают и оттаивают, а пробу надосадочной жидкости инокулируют в свежую клеточную культуру. Проводят до трех пассажей по 48 часов каждый. Для того, чтобы обнаружить присутствие антигена вируса ВС, осветленные надосадочные жидкости каждого пассажа тестируют с использованием ИФА, РСК или ПЦР.

1.5. Твердофазный иммуноферментный анализ

Непрямой сэндвич ИФА (IS-ELISA) (Alonso *et al.*, 1991; Ferris & Donaldson, 1988) является в настоящее время предпочитаемым диагностическим методом для идентификации

серотипов вируса ВС и других везикулярных болезней. В частности, процедура ИФА с набором поливалентных антисывороток кроликов/морских свинок, приготовленных против вирионов репрезентативных штаммов трех подтипов серотипа IND, идентифицирует все штаммы вируса ВС серотипа IND (Alonso *et al.*, 1991). Для обнаружения вируса ВС серотипа NJ подходит моновалентная антисыворотка кроликов/морских свинок (Alonso *et al.*, 1991; Ferris & Donaldson, 1988).

1.5.1. Процедура тестирования

- i) *Твердая фаза:* Планшеты для ИФА покрывают на 1 час при 37°C или на ночь при 4°C кроличьей антисывороткой и нормальной кроличьей сывороткой (как описано у Alonso *et al.*, 1991) и оптимально разводят в карбонатном/бикарбонатном буфере, pH 9,6. В дальнейшем планшеты промывают один раз забуференным фосфатом солевым раствором (ЗФР) и блокируют в течение 1 часа при комнатной температуре с помощью 1% овальбумина сорта V (степень очистки) в ЗФР. Планшеты используют сразу же после промывки или хранят при -20°C в целях будущего применения.
- ii) *Опытные пробы:* Антигенные суспензии опытных проб (10-20% суспензия эпителиальной ткани, или скелетно-мышечная ткань куриных эмбрионов в ЗФР, или минимальная поддерживающая среда (МЕМ), или неразведенная осветленная надосадочная жидкость клеточной культуры) вносят в соответствующие лунки и планшеты инкубируют в течение 1 часа при 37°C на орбитальном встряхивателе.
- iii) *Детектор:* Моновалентные и поливалентные антисыворотки морских свинок к вирусу ВС серотипов NJ и IND, соответственно, которые являются гомологичными покрытой кроличьей сыворотке и которые были разведены должным образом в ЗФР, содержащем 0,05% Твин 20, 1% овальбумин сорта II, 2% нормальную кроличью сыворотку и 2% нормальную бычью сыворотку (PBSTB) добавляют в соответствующие лунки и оставляют реагировать в течение 30-60 минут при 37°C на орбитальном встряхивателе.
- iv) *Конъюгат:* Пероксидаза/кроличий или козий IgG против морской свинки Ig конъюгат, разведенный в PBSTB, добавляют и оставляют реагировать в течение 30-60 минут при 37°C на орбитальном встряхивателе.
- v) *Субстрат:* H₂O₂-активированный субстрат добавляют и оставляют реагировать при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим добавлением серной кислоты для остановки реакции. Показатели абсорбции измеряют с использованием ИФА-ридера. При проведении теста используют 50-мкл объемы реагентов. Между каждым этапом планшеты промывают три-пять раз ЗФР, содержащим 0,05% Твин 20. Контроли для используемых реагентов включены.
- vi) *Интерпретация результатов:* Показатели абсорбции контрольных лунок с положительными и отрицательными антигенами должны быть в пределах, указанных для принятия значений. Лунки с пробами, дающие абсорбцию $\geq 0,3$, считаются положительными в отношении соответствующего подтипа вируса. Значения абсорбции $< 0,3$ - $0,2$ считаются подозрительными, а значения $< 0,2$ считаются отрицательными в отношении соответствующего подтипа вируса. Подозрительные и отрицательные пробы следует инокулировать в

клеточную культуру, а пассажи должны повторно тестироваться в ИФА.

1.6. Реакция связывания комплемента

ИФА предпочтительнее РСК, так как он более чувствительный и на него не оказывают воздействия про- или анти-комплементарные факторы. Если в наличии нет реагентов для ИФА, тогда можно проводить РСК. Описана РСК на титрационных микропланшетах с U-образным дном с использованием реагентов, титрованных в СК50% тесте.

1.6.1. Процедура тестирования

i) *Антисыворотки*: Морских свинок моновалентные против подтипа NJ вируса ВС и поливалентные против подтипа IND вируса ВС антисыворотки, разведенные в вероналовом буфере (ВБ) в разведении, содержащем 2,5 КСЕ₅₀ (50% комплемент-связывающие единицы) против гомологичного вируса, вносят в лунки планшета. Эти антисыворотки являются детекторами, используемыми в ИФА.

ii) *Опытные пробы*: Антигенную суспензию опытных проб, приготовленную как описано для непрямого сэндвич ИФА, вносят в лунки с сывороткой.

iii) *Комплемент*: 4 КГЕ₅₀ (50% гемолитические единицы комплемента) добавляют к сыворотке и антигену. (Альтернативой является использование 7,5; 10 и 20 КГЕ₅₀ в целях достижения 4 КГЕ₅₀ в тесте). Смесь антисывороток, опытных проб и комплемента инкубируют при 37°C в течение 60 минут.

iv) *Гемолитическая система*: Суспензию овечьих эритроцитов (SRBC) в вероналовом буфере (ВБ), сенсibilизированную 10 ГЕ₅₀ (50% гемолитические единицы) кроличьей анти-SRBC сыворотки, добавляют в лунки. Гемолитическая система имеет показатель абсорбции 0,66 при 545 нм в пропорции два объема гемолитической системы + три объема дистиллированной воды. Смесь инкубируют в течение 30 минут при 37°C. Затем планшеты центрифугируют и визуально наблюдают за реакцией.

Необходимы объемы 25 мкл антисывороток, опытных сывороток и комплемента и 50 мкл гемолитической системы. Соответствующие контроли для антисывороток, антигенов, комплемента и гемолитической системы включены.

Можно проводить СК50% в пробирках (Alonso *et al.*, 1991) с использованием объемов реагентов в 200 мкл (в восемь раз превышающих объемы, указанные для СК на титрационных микропланшетах). При проведении СК50% реакцию можно выражать в виде показателя абсорбции, считанного спектрофотометрически при 545 нм.

v) *Интерпретация результатов*: Если контроли такие, как ожидалось, пробы с гемолизом <20% для одной антисыворотки в сравнении с другой антисывороткой и контроли считают положительными для соответствующего типа.

Полевые пробы, которые являются отрицательными по результатам ИФА или РСК, следует вводить в клеточную культуру. Если нет подтверждения вирусной инфекции после трех пассажей, образец считают отрицательным в отношении вируса.

1.7. Методы распознавания нуклеиновых кислот

Для амплификации небольших геномных областей вируса ВС может использоваться ОТ-ПЦР (Hofner *et al.*, 1994; Hole *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 2009). Этот метод будет обнаруживать наличие вирусной РНК в образцах ткани и везикулярной жидкости и клеточной культуре, но с его помощью нельзя определить является ли вирус

инфекционным. Вообще приемы ПЦР не использовались на рутинной основе для скрининговой диагностики вызывающих везикулярный стоматит вирусов.

2. Серологические тесты

Для идентификации и количественного определения специфических антител в сыворотке предпочтительнее использовать ИФА и реакцию вируснейтрализации. РСК можно использовать для количественного определения ранних антител. Антитела можно обычно обнаружить в период с 5 по 8 день после инфекции; продолжительность персистенции антител не была точно установлена тремя тестами, но по показаниям РСК она относительно короткая, а по показаниям ВН и ИФА довольно продолжительная (Katz *et al.*, 1997).

2.1. Жидкофазный блокирующий твердофазный иммуноферментный анализ (предписанный для международной торговли тест)

Жидкофазный блокирующий иммуноферментный анализ (LP-ELISA) является методом для обнаружения и количественного определения антител к вирусам серогруппы ВС. Рекомендуется использование вирусных гликопротеинов в качестве антигена, так как они не являются инфекционными, позволяют обнаруживать нейтрализующие антитела и дают меньше ложно-положительных результатов по сравнению с реакцией вируснейтрализации (Allende *et al.*, 1992).

2.1.1. Процедура тестирования

- i) *Твердая фаза:* Как описано выше в Разделе В.1.5 в отношении IS-ELISA.
- ii) *Жидкая фаза:* На титрационных микропланшетах с лунками, имеющими U-образное дно, готовят дубликатные двукратные-пятикратные разведения каждой опытной сыворотки, начиная с 1/4. Равный объем гликопротеина вируса ВС серотипа NJ или IND в предопределенном разведении добавляют в каждую лунку и планшеты инкубируют в течение 1 часа при 37°C. 50 мкл этих смесей затем переносят на ИФА-планшеты с твердой фазой и оставляют реагировать в течение 30 минут при 37°C на орбитальном встряхивателе.
- iii) *Детектор, конъюгат и субстрат:* Используют те же этапы, которые описаны для IS-ELISA, с использованием моновалентных антисывороток, гомологичных опытному антигену, в качестве детекторов.
- iv) *Интерпретация результатов:* Согласно методу Спирмана-Кербера 50% конечные точки титрования выражают в \log_{10} в отношении 50% ОП антигенного контроля. Титры $>1,0$ (1/10) считают положительными.

2.2. Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (предписанный для международной торговли тест)

Для обнаружения антител был также разработан конкурентный ИФА. Описанная здесь процедура базируется на процедуре, описанной Afshar *et al.* (1993). Она использует рекомбинантные антигены вируса везикулярного стоматита серотипа NJ и подтипа IND-1 согласно описанию Katz *et al.* (1995).

2.2.1. Процедура тестирования

- i) *Твердая фаза:* Антигены разводят в карбонатном/бикарбонатном буфере, pH 9,6, и 75 мкл добавляют в каждую лунку 96-луночного ИФА-планшета. Планшеты инкубируют в течение ночи при 4°C; сенсibilизированные планшеты можно замораживать с антигеном *in-situ* при -70°C в течение до 30 дней. Планшеты оттаивают,

антиген декантируют и добавляют 100 мкл блокирующего раствора (5% раствор порошка обезжиренного сухого молока в ЗФР [например, 5 г порошка сухого молока, растворенного в 95 мл ЗФР]). Планшеты затем инкубируют при 25°C в течение 15-30 минут и декантируют блокирующий раствор. Планшеты промывают три раза ЗФР/0,05% раствором Твин 20.

- ii) *Жидкая фаза*: 50 мкл сыворотки, разведенной в пропорции 1/8 в 1% обезжиренном сухом молоке в ЗФР, добавляют в каждую из дубликатных лунок для каждой пробы. Каждый ИФА-планшет должен включать положительную и отрицательную контрольную сыворотку для каждого серотипа. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Без промывки 50 мкл жидкости из биореактора добавляют в каждую лунку и планшеты инкубируют при 37°C в течение 30 минут.
- iii) *Детектор*: Планшеты промывают три раза и в каждую лунку добавляют 50 мкл козьего анти-мышинного конъюгата пероксидазы хрена, разведенного в 1% обезжиренном сухом молоке с 10% нормальной козьей сывороткой. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 30 минут, промывают три раза и добавляют в каждую лунку 50 мкл тетраметил-бензидин (ТМВ) субстратного раствора. Планшеты инкубируют при 25°C в течение 5-10 минут, а затем в каждую лунку добавляют 50 мкл 0,05% серной кислоты. Результаты считывают с планшетов при 450 нм и оптическая плотность разбавителя в контрольных лунках должна быть >1,0.
- iv) *Интерпретация результатов*: Пробу считают положительной, если показатель абсорбции составляет 50% показателя абсорбции контроля. Следует учитывать, что лошади, естественно инфицированные вирусом Нью-Джерси, были положительными по результатам этого анализа, по меньшей мере, в течение 8 лет после заражения.

2.3. Реакция вируснейтрализации (предписанный для международной торговли тест)

Реакцию вируснейтрализации проводят на титрационных микропланшетах с плоским дном лунок для тканевых культур с использованием в качестве опытной пробы инактивированной сыворотки, 1000 ТЦД₅₀ (50% инфицирующая культура ткани доза) вируса ВС серотипов NJ и IND и клеток Vero M или предварительно сформированного монослоя (Allende *et al.*, 1992) или суспензии клеток IB-RS-2 с целью тестирования на наличие ненейтрализованного вируса.

2.3.1. Процедура тестирования

- i) *Вирус*: Вирус везикулярного стоматита серотипов NJ или IND, выращенный в монослоях клеток Vero и хранящийся в жидком азоте или в замороженном виде при -70°C.
- ii) *Опытные пробы*: Перед тестированием сыворотки инактивируют при 56°C в течение 30 минут. В тест включают положительные и отрицательные контрольные стандартные сыворотки.
- iii) *Нейтрализация вируса*: Сыворотки разводят на планшетах двукратно или четырехкратно, начиная с разведения 1/4. На каждую сыворотку используют два ряда лунок. Добавляют тот же объем суспензии вируса ВС серотипов NJ или IND, содержащей около 1000 ТЦД₅₀/25 мкл, и инкубируют при 37°C в течение 60 минут, чтобы произошла нейтрализация. Далее на образованные клеточные монослои на титрационных микропланшетах наносят 50 мкл смесей

или в каждую лунку со смесями сыворотки/вируса добавляют 150 мкл 300000/мл IB-RS-2 или суспензию клеток Vero. Планшеты закрывают свободно подогнанными крышками и инкубируют в течение 48-72 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂ или запечатывают чувствительной к давлению лентой и инкубируют в нормальной атмосфере. (Было установлено, что вирус с титром 1000 ТЦД₅₀/25 мкл будет снижать неспецифические реакции и поддерживать высокий уровень чувствительности).

- iv) *Интерпретация результатов:* Лунки без ЦПД считают положительными. Конечные точки титрования опытных сывороток определяют с помощью метода Спирмана-Кербера, когда титры вируса находятся в диапазоне между 750 и 1330 ТЦД₅₀ и когда титры положительных и отрицательных стандартных сывороток составляют двукратное значение их средних величин, как установлено при предшествующем титровании. Титры 100% нейтрализации каждой сыворотки выражают в виде log 10. Сыворотки со значениями 1/32 или выше считают положительными в отношении антител к вирусу везикулярного стоматита. Следует иметь в виду, что лошади, естественно инфицированные вирусом Нью-Джерси, были положительными по результатам этого анализа, по меньшей мере, в течение 8 лет после заражения. При альтернативном протоколе используется доза вируса в 1000 ТЦД₅₀ на миллилитр смеси вируса/сыворотки и инкубирование при 37°C в течение 60 минут для осуществления нейтрализации. Далее на образованные клеточные монослои на титрационных микропланшетах наносят 100 мкл смесей. Планшеты закрывают свободно подогнанными крышками и инкубируют в течение 48 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Лунки без ЦПД считают положительными. Конечные точки титрования опытной сыворотки определяют с помощью метода Спирмана-Кербера, когда титры вируса находятся между 10^{2±0,5}/100 мкл и когда титры положительных и отрицательных стандартных сывороток в два раза выше их средних значений, установленных при предшествующем титровании. Титр 50% нейтрализации каждой сыворотки выражают как log 10. Сыворотки со значениями 1,3 (1/20) или выше считают положительными в отношении антител к вирусу везикулярного стоматита (Allende *et al.*, 1992).

Референтные лаборатории МЭБ по ВС в настоящее время проводят оценку и сравнение описанных выше протоколов. Оба широко используются и могут давать приемлемые результаты.

2.4. Реакция связывания комплемента (предписанный для международной торговли тест)

Подробное описание этого теста приведено в Разделе В.1.6. Он модифицирован следующим образом. Реакция связывания комплемента может применяться для количественного определения ранних антител, главным образом IgM. С этой целью двукратные разведения сыворотки смешивают с 2 КСЕ₅₀ известного антигена и 5% нормальной бычьей или телячьей сывороткой, включенной в 4 КГЕ₅₀ комплемента. Смесь инкубируют в течение 3 часов при 37°C или в течение ночи при 4°C. Затем добавляют гемолитическую систему и проводят инкубирование в течение 30 минут при 37°C. Титр сыворотки – это наивысшее разведение, при котором наблюдают гемолиз. Титры 1/5 или выше считают положительными. Эта реакция связывания комплемента имеет низкую

чувствительность и на нее часто оказывают пагубное влияние антикомплементарные или неспецифические факторы.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Предпосылки

1.1. Логическое обоснование и целевое назначение продукта

Инфекции вирусом везикулярного стоматита могут оказывать существенное влияние на здоровье и производственные аспекты животных, имея результатом значительные экономические потери производителей. Сниженное потребление кормов из-за поражений в ротовой полости может приводить к потере веса и задержкам в размещении на рынке. Поражения на конечностях могут вызывать временные локомоторные проблемы, влияющие на способность животного получать пищу и воду, и постоянные проблемы с конечностями, приводящие к отбраковке животного. Поражения молочных желез могут влиять на способность матки выкармливать потомство и на сбор молока для продажи. Животных могут отбраковывать, если поражения молочных желез и сосков тяжелые. Если применяется вакцинация, то вакцина используется для снижения тяжести клинических признаков и экономических последствий болезни.

Аттенуированные вирусные вакцины были протестированы в полевых условиях в США, Панаме, Гватемале, Перу и Венесуэле (Lauerman *et al.*, 1962; Mason, 1978) с неустановленной эффективностью. Убитые вакцины против серотипов Indiana и New Jersey производят в Колумбии и Венесуэле (проведенный МЭБ в 2002 году надзор за вакцинами). Несмотря на то, что коммерческая вакцина, объединяющая антигены вирусов ВС и ящура в одной эмульсии, для андийских стран была протестирована в экспериментах по вакцинации-контрольному заражению и данные были опубликованы (House *et al.*, 2003), на рутинной основе она не производится и не применяется.

Руководства по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.6 *Принципы производства вакцин ветеринарного назначения*. Указания, приведенные здесь и в Главе 1.1.6, являются общими по природе и могут дополняться национальными и региональными требованиями.

2. Основные принципы производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Идентичность посевного материала и источник сыворотки, используемой для выращивания и пассирования вируса, должны быть хорошо документированы, включая источник и историю пассирования организма.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от чужеродных агентов)

Необходимо продемонстрировать чистоту посевного материала и клеток, используемых при производстве вакцин. Исходный вакцинный вирус должен быть свободен от чужеродных агентов, бактерий или микоплазм, и это следует показать с использованием

чувствительных для обнаружения этих микроорганизмов тестов. Опытная аликвота должна быть репрезентативной для титра, необходимого для производства вакцины, но титр не должен быть до такой степени высоким, чтобы гипериммунные антисыворотки не могли нейтрализовать посевной вирус во время тестирования чистоты. Посевной вирус нейтрализуется моноспецифической антисывороткой или моноклональными антителами против посевного вируса, а смесь вируса/антител культивируют на нескольких типах монослоев клеточных линий. Клеточную линию высокого разрешения для вируса типов 1 и 2 вирусной диареи КРС рекомендуют как одну из клеточных линий, выбранных для оценки исходного вакцинного вируса. Вирус вирусной диареи КРС является потенциальным контаминантом, интродуцируемым через применение фетальной бычьей сыворотки в системах клеточных культур. Культуры подвергают последующим пассажам с интервалами в 7 дней в течение, по меньшей мере, 14 дней, затем тестируют на наличие чужеродных вирусов, которые могут инфицировать клетки или посевной материал во время предшествующих пассажей.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Как только будет доказано, что вакцина является эффективной, а предлагаемые условия производства приемлемы для регулирующих органов, может быть дано разрешение на производство вакцины. Посевной вирус можно выращивать в культуре клеток. Выбор типа клеток для культуры зависит от степени адаптации вируса, роста в среде и урожая вируса в специфической культуральной системе. Вакцинные продукты должны иметь ограниченное количество пассажей от исходного вакцинного вируса, показавшее свою эффективность. Обычно с широкомасштабными монослойными или суспензионными клеточными системами проводят манипуляции при строго контролируемой температуре, в асептических условиях и с использованием определенных методов производства в целях обеспечения постоянства от серии к серии. Доза вируса, используемого для инокулирования клеточной культуры, должна поддерживаться на минимальном уровне для снижения потенциала вирусных дефектных интерферирующих частиц. Если по показаниям ЦПД, реакции флуоресцирующих антител или другого утвержденного метода вирус достиг соответствующего титра, вирус очищают, фильтруют и инактивируют (в случае инаktivированных вакцин).

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Клеточные культуры должны быть свободными от случайных вирусов. Все продукты животного происхождения, используемые при производстве и поддержании клеток (а именно, трипсин, фетальная бычья сыворотка) и выращивании вируса должны быть свободными от случайных агентов, а особое внимание следует уделять присутствию вируса вирусной диареи КРС.

2.2.3. Контроль в процессе производства

Клеточные культуры следует проверять микроскопически на присутствие аномалий или признаков контаминации и отбраковывать в случае их неудовлетворительного состояния. Концентрацию вируса можно оценивать с использованием анализа антигенной массы или инфекционности.

Изучение кинетики инаktivации следует проводить с использованием санкционированного инаktivированного агента (β -пропиолактон или этиленмин в

бинарной форме) на каждой серии вируса с титром выше максимального производственного титра и выращенного с использованием одобренного производственного метода. Это изучение должно продемонстрировать, что метод инактивации является адекватным для обеспечения полной инактивации вируса. Пробы, отбираемые во время инактивации с равными временными интервалами, а затем инокулированные на чувствительную клеточную линию, должны показывать линейную и полную потерю титра к концу процесса инактивации.

Во время производства измеряют содержание антигена для того, чтобы установить тот факт, что были достигнуты минимальные титры. Содержание антигенов обычно измеряют до инактивации (в случае инактивированной вакцины) и до последующей переработки.

2.2.4. Тестирование партий конечной продукции

Вакцинные кандидаты должны быть чистыми, безопасными, иммуногенными и эффективными.

i) Стерильность и чистота

Во время производства следует проводить тесты на контаминацию инактивированных и живых вакцин бактериями, микоплазмами и грибами и подтверждать их отсутствие в готовом продукте (см. Главу 1.1.9 *Тесты на стерильность и свободу биологических материалов от контаминации*).

ii) Безопасность

Следует тестировать пробы готовых инактивированных вакцин из конечных контейнеров.

iii) Иммуногенность серии

Иммуногенность исследуют на готовом сформулированном продукте. Копируя то, как проводится тест на иммуногенность в отношении противоящурной вакцины, было предложено тестировать вакцины против ВС с использованием вакцинации-контрольного заражения (House *et al.*, 2003). Пробелы в знаниях относительно патогенеза инфекции вирусом ВС связаны с ограничениями в разработке и претворении в жизнь валидированного протокола проведения теста по контрольному заражению. Однако для выпуска партии могут также использоваться не прямые тесты по соображениям практичности и благополучия животных при условии, что была валидирована корреляция к защите у целевого животного при проведении тестов на эффективность. Часто не прямые тесты на иммуногенность включают титрование антител после вакцинации целевых видов. В идеальном случае не прямые тесты проводят для каждого штамма для одного вида и каждой формуляции вакцины с целью установления корреляции между результатами непрямого теста и результатами тестирования эффективности вакцины.

Относительную иммуногенность можно использовать для определения содержания антигенов в конечном продукте. Необходимо подтверждать чувствительность, специфичность, воспроизводимость и надежность таких анализов.

2.3. Требования к авторизации

2.3.1. Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Конечный продукт можно оценивать на животном-хозяине с использованием двух животных минимального рекомендованного возраста согласно инструкциям на этикетке; за животными наблюдают в течение 21 дня. Также рекомендуется проводить исследования на вакцинированных животных в полевых условиях, по меньшей мере, в трех неоднородных географических районах с плотностью 300 животных на район.

Что касается инактивированных вакцин и вакцин из модифицированного живого вируса, то безопасность продукта будет базироваться на отсутствии побочных реакций, таких как шок, абсцессы на месте прививки, т.д. В специфическом случае с вакцинами из модифицированного живого вируса можно ожидать появления клинических признаков. Если наблюдаются клинические признаки везикулярного стоматита, использование вакцины следует пересмотреть. Остаточный вирус следует оценивать до смешивания антигена с адьювантом. Первоначальную безопасность оценивают на нескольких животных в течение 21 дня при внимательном наблюдении за появлением угроз безопасности. Если вакцина проходит это первое тестирование безопасности, вакцину применяют в полевых условиях на большем количестве животных для оценки того, имеются ли едва различимые проблемы с безопасностью: побочные реакции/опухоли, абсцессы, шок, т.д.

ii) Возврат к вирулентности у аттенуированных/живых вакцин

Возврат к вирулентности у живых вирусных вакцин часто подтверждает обратный пассаж через восприимчивые виды. Вирус выделяют у вакцинированного животного, и выделенный вирус затем используют для прививки дополнительных животных. Последовательный пассаж через животных должен показать, что животные остаются клинически здоровыми без демонстрации типичных для везикулярного стоматита поражений.

iii) Вопросы окружающей среды

Инактивированные вакцины против везикулярного стоматита, вероятно, не представляют особой опасности для того, кто ее применяет, хотя случайное введение может привести к побочной реакции в результате воздействия адьюванта и вторичных компонентов вакцины. Вакцины из модифицированного живого вируса могут представлять угрозу для того, кто ее использует, в зависимости от уровня инактивации вируса.

Насколько возможно, следует избегать применения консервантов, а если это невозможно сделать, тогда необходимо ограничиваться наименьшей концентрацией. Вакцинные флаконы, шприцы и иглы для вакцин с адьювантами или консервантами или вакцин из модифицированного живого вируса могут представлять угрозу для окружающей среды. Инструкции по утилизации следует включать в информацию, которая вкладывается в упаковку с вакциной, и они должны базироваться на действующих регламентах по окружающей среде в стране применения.

2.3.2. Требования к эффективности

Пробелы в знаниях относительно патогенеза инфекции вирусом ВС и иммунного механизма, который обеспечивает защиту против вирусной инфекции, являются ограничительными мерами с точки зрения разработки и применения валидированного протокола для тестирования эффективности. В идеальном случае эффективность вакцины

следует устанавливать непосредственно на вакцинированных животных путем оценки их устойчивости к контрольному заражению живым вирусом. Эффективность вакцины следует устанавливать для каждого штамма, имеющего разрешение на использование в вакцине.

Живые референтные вирусы ВС, соответствующие вирусным штаммам, циркулирующим в регионе, хранят при ультранизких температурах. Каждый контрольный вирус готовят следующим образом. Ткань языка, инфицированную вирусом ВС, следует получать из первоначального полевого случая ВС и доставлять ее следует в референтную лабораторию в глицериновом буфере, как описано в Разделе В *Диагностические методы*.

Контрольный вирус КРС готовят в соответствии с процессом, описанным в Главе 2.1.8. *Ящур*, Разделе В.1.1. *Выделение вируса*, с тем, чтобы получить стерильную 10% суспензию в минимальной поддерживающей среде Игла с 10% стерильной фетальной бычьей сывороткой.

Запас контрольного вируса, который подлежит делению на аликвоты, готовят, начиная с отбора поражений от двух голов КРС в возрасте старше 6 месяцев, признанных ранее свободными от антител к вирусу ВС. Этим животных успокаивают с использованием, например, 100 мг/мл ксилазина (в соответствии с инструкцией по применению), затем спустя 2 дня прививают интрадермально в язык суспензией в 20 точек.

2% суспензию готовят вышеуказанным способом и фильтруют через 0,2 мкм фильтр, делят на аликвоты и замораживают в газовой фазе жидкого азота, и это будет запас контрольного вируса. Инфекционные титры этого запаса определяют и в клеточной культуре (ТЦД₅₀), и на двух головах КРС (БИД₅₀). Этим двум животным, которые были успокоены с использованием ксилазина, вводят интрадермально в язык десятикратные разведения (1/10 через 1/10000) из расчета одно разведение на четыре точки (Henderson, 1949). Показатели титрования считывают 2 дня спустя. Чаще всего, по результатам метода Спирмана-Кербера титры выше 10⁶ ТЦД₅₀ для 0,1 мл и выше 10⁵ БИД₅₀ для 0,1 мл. Разведение для использования в тесте по контрольному заражению КРС составляет 10000 БИД₅₀ в общем объеме 4x0,1 мл при интралингвальном введении в тесте PD₅₀ и тесте PGP (House *et al.*, 2003).

i) Метод вакцинации-контрольного заражения

Для этого экспериментального метода группу из 12 голов серонегативного по вирусу ВС КРС в возрасте, по меньшей мере, 6 месяцев вакцинируют на день 0 и день 40 дозой для КРС способом и в объеме, рекомендуемыми изготовителем. Этим животных и контрольную группу из двух невакцинированных животных контрольно прививают через 2 или более недели после второй вакцинации. Контрольный штамм представляет суспензию вируса КРС, которая является полностью вирулентной и соответствует вирусным типам в тестируемой вакцине при интрадермальном введении 10000 БИД₅₀ в четыре точки (0,1 мл на точку) в верхнюю поверхность языка. После контрольного заражения за животными наблюдают в течение 7-8 дней.

Было предложено считать вакцинированных животных без поражений на языке полностью защищенными. Вакцинированных животных с поражениями в одной, двух или трех точках прививки следует считать частично защищенными, а животные с поражениями в четырех точках считаются незащищенными (House *et al.*, 2003). Контрольные животные должны иметь поражения на четырех участках. Вакцина должна полностью защищать, по меньшей мере, девять животных из 12 вакцинированных (75%

защита), остальные животные защищены частично или не защищены. Этот тест дает определенную степень защиты после введения двух доз для КРС коммерческой вакцины ограниченной популяции КРС.

Несмотря на то, что метод вакцинации-контрольного заражения был описан и опубликован (House *et al.*, 2003), данные по валидации в полевых условиях эффективности вакцины отсутствуют.

ii) Эффективность у других видов

Тесты в отношении эффективности у других целевых видов, таких как лошади, еще пока не описаны и не стандартизированы. Обычно успешный тест на КРС следует считать достаточным для подтверждения качества вакцины против ВС и утверждения ее применения на других видах.

2.3.3. Продолжительность иммунитета

Продолжительность иммунитета (D.O.I.), выработанного вакциной против ВС, будет зависеть от эффективности (формуляция и антигенная нагрузка). Как часть процедуры авторизации/лицензирования от изготовителя требуется продемонстрировать продолжительность иммунитета после применения данной вакцины путем контрольного заражения или использования валидированного альтернативного теста, такого как серология, в конце заявленного периода защиты.

2.3.4. Стабильность

Стабильность всех вакцин, включая эмульсионно-масляные вакцины, следует демонстрировать как часть определения срока годности для авторизации/лицензирования. Вакцины никогда не следует замораживать или хранить при температурах выше целевых.

i) Для животноводства

Вирус(ы) при производстве вакцины должен быть антигенно релевантным вирусу(ам), циркулирующему в полевых условиях. Изучение вакцинации/контрольного заражения на видах, на которых вакцина будет применяться, покажет степень защиты, обеспечиваемой вакциной. Виды животных, используемые в изучении вакцинации/контрольного заражения, должны быть свободными от антител против вируса везикулярного стоматита. Исследования вакцинации/контрольного заражения следует проводить с использованием вируса, полученного надлежащим производственным методом при максимальном разрешенном числе пассажей и применении экспериментальной животной модели. Необходимо подтверждать чувствительность, специфичность, воспроизводимость, статистическую значимость и уровень достоверности такой экспериментальной модели.

Уровни антител после вакцинации, измеренные *in vitro*, могут использоваться для оценки эффективности вакцины при условии изучения статистически значимой корреляции. Что касается вакцин, содержащих более одного вируса (например, Нью-Джерси и Индиана-1), то эффективность различных компонентов этих вакцин следует устанавливать независимо друг от друга, а затем как комбинацию в случае интерференции между различными вирусами.

Продолжительность иммунитета и рекомендуемую периодичность вакцинации следует определять до того, как будет утвержден продукт. Первоначально такая информация

требуется непосредственно для изучения вакцинации/контрольного заражения животных-хозяев. Указание периода защиты, установленного исходя из способности вакцинированных животных противостоять контрольному заражению в обоснованном тесте, может быть включено в требования на вакцинной этикетке.

Если вакцина должна использоваться на лошадях, свиньях, КРС или других жвачных животных, предназначенных для размещения на рынке и для потребления человеком, следует устанавливать время выведения с учетом используемого адъюванта (обычно 21 день) с использованием таких средств как гистопатологическое исследование, проводимое соответствующими органами, регулирующими безопасность пищевых продуктов.

ii) Для контроля

Те же принципы применяются в отношении производства животных. Кроме того, следует отметить, что ответы антител у вакцинированных животных можно не отличить от ответов у животных, подвергшихся воздействию полевого вируса. Поэтому, вакцинированные животные должны четко идентифицироваться, если серологические методы будут использоваться в тесной привязке к совместимым клиническим признакам для оценки заражения полевым вирусом.

2.3.5. Стабильность

Вакцины следует хранить при 4°C-8°C с минимальным подверганием воздействию света. Срок годности следует определять с помощью санкционированного тестирования иммуногенности (Раздел С.2.2.4.iii) по окончании периода годности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AFSHAR A., SHAKARCHI N.H. & DULAC G.C. (1993). Development of a competitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine, equine, ovine and porcine antibodies to vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1860–1865.

ALONSO A., MARTINS M., GOMES M.P.D., ALLENDE R. & SONDAHL M.S. (1991). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing and subtyping of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 287–292.

ALONSO FERNANDEZ A. & SONDAHL M.S. (1985). Antigenic and immunogenic characterisation of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Cen. Panam. Fiebre Aftosa*, **51**, 25–30.

ALLENDE R., SEPULVEDA L., MENDES DA SILVA A., MARTINS M., SONDAHL M.S. & ALONSO FERNANDEZ A. (1992). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prev. Vet. Med.*, **14**, 293–301.

BORING W. & SMITH D. (1962). Vesicular Stomatitis Virus: A Survey and Analysis of the Literature. Technical Study No. 43, US Army Biological Laboratories, Fort Detrick, USA.

COMER S.A., CORN J.L., STALLKNECHT D.E., LANDGRAF J.G. & NETTLES V.F. (1992). Titers of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in naturally infected male and female *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in Georgia. *J. Med. Entomol.*, **29**, 368–370.

COTTON W.E. (1927). Vesicular stomatitis. *Vet. Med.*, **22**, 169–175.

- FEDERER K.E., BURROWS R. & BROOKSBY J.B. (1967). Vesicular stomatitis virus – the relation between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, **8**, 103–117.
- FERRIS N.P. & DONALDSON A.I. (1988). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of VSV antigen. *Vet. Microbiol.*, **18**, 243–258.
- FRANCY D.B., MOORE C.G., SMITH G.C., TAYLOR S.A. & CALISER C.H. (1988). Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: isolation of virus from insects collected along the northern Colorado Rocky Mountain Front Range. *J. Med. Entomol.*, **25**, 343–347.
- HANSON R.P. (1952). The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriol. Rev.*, **16**, 179–204.
- HENDERSON W.M. (1949). The quantitative study of foot and mouth disease virus. Agricultural Research Council Report Series No. 8, HMSO, London, UK, page 5.
- HOFNER M.C., CARPENTER W.C., FERRIS N.P., KITCHING R.P. & BOTERO F.A. (1994). A hemi-nested PCR assay for the detection and identification of vesicular stomatitis virus nucleic acid. *J. Virol. Methods*, **50**, 11–20.
- HOLE K., VELAZQUES-SALINAS L. & CLAVIJO A. (2010). Improvement and optimization of a multiplex real time RT-PCR assay for the detection and typing of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 428–433.
- HOUSE J.A., HOUSE C., DUBOUGET P. & LOMBARD M. (2003). Protective immunity in cattle vaccinated with a commercial scale inactivated, bivalent vesicular stomatitis vaccine. *Vaccine*, **21**, 1932–1937.
- JENNY E.W., MOTT L.O. & TRAUB E. (1958). Serological studies with the virus of vesicular stomatitis. I. Typing of vesicular stomatitis by complement fixation. *Am. J. Vet. Res.*, **19**, 993–998.
- KATZ J.B., EERNISSE K.A., LANDGRAF J.G. & SCHMITT B.J. (1997). Comparative performance of four serodiagnostic procedures for detecting bovine and equine vesicular stomatitis virus antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 329–331.
- KATZ J.B., SHAFER A.L. & EERNISSE K.A. (1995). Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. *J. Virol. Methods*, **54**, 145–157.
- KILLMASTER L.F., STALKNECHT D.E., HOWERTH E.W., MOULTON J.K., SMITH P.F. & MEAD D.G. (2011). Apparent disappearance of vesicular stomatitis New Jersey virus from Ossabaw Island, Georgia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**, 559–565.
- LAUERMAN L.H., KUNS M.L. & HANSON R.S. (1962). Field trial of live virus vaccination procedure for prevention of vesicular stomatitis in dairy cattle. I: Preliminary immune response. Proceedings of the 66th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 365–369.
- MASON J. (1978). The epidemiology of vesicular stomatitis. *Bol. Cen. Panam. Fiebre Aftosa*, **29–30**, 35–53.

MEAD D.G., LOVETT K.R., MURPHY M.D., PAUSZEK S.J., SMOLIGA G., GRAY E.W., NOBLET R., OVERMYER J. & RODRIGUEZ L.L. (2009). Experimental transmission of vesicular stomatitis New Jersey virus from *Simulium vittatum* to cattle: clinical outcome is influenced by site of insect feeding. *J. Med. Entomol.*, **46**, 866-872.

MEAD D.G., GRAY E.W., MURPHY M.D., HOWERTH E.W. & STALLKNECHT D.E. (2004). Biological transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to domestic swine (*Sus scrofa*). *J. Med. Entomol.*, **41**, 78-82.

OLTSKY P.K., TRAUM J. & SCHOENING H.W. (1926). Comparative studies on vesicular stomatitis and foot and mouth disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **70**, 147–167.

RODRIGUEZ L.L., LETCHWORTH G.J., SPIROPOULOU C.F. & NICHOL S.T. (1993). Rapid detection of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2016–2020.

SELLERS R.F. & MAAROUF A.R. (1990). Trajectory analysis of winds in vesicular stomatitis in North America. *Epidemiol. Infect.*, **104**, 313–328.

WILSON W.C., LETCHWORTH G.J., JIMENEZ C., HERRERO M.V., NAVARRO R., PAZ P., CORNISH T.E., SMOLIGA G., PAUSZEK S.J., DORNAK C., GEORGE M. & RODRIGUEZ L.L. (2009). Field evaluation of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21**, 179-186.

*

* *

NB: Имеются референтные лаборатории МЭБ по везикулярному стоматиту (см. Таблицу в Части 4 этого Руководства МЭБ по наземным животным проконсультируйтесь на веб-сайте МЭБ относительно самого последнего списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).
Пожалуйста, обращайтесь в референтные лаборатории МЭБ за получением дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам в отношении везикулярного стоматита