

## Глава 3.1.8.

### ЯЩУР

### (ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ЯЩУРА)

---

#### РЕЗЮМЕ

*Ящур является самым контагиозным заболеванием млекопитающих животных и обладает большим потенциалом в плане нанесения серьезных экономических потерь у восприимчивых парнокопытных животных. Существует семь серотипов вируса ящура, а именно, O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 и Азия 1. Заражение вирусом одного серотипа не обеспечивает выработку иммунитета к другому серотипу. По клиническим проявлениям ящур невозможно отличить от других везикулярных заболеваний, таких как везикулярная болезнь свиней, везикулярный стоматит и везикулярная экзантема. Поэтому, лабораторная диагностика любых подозрительных случаев ящура имеет особую важность.*

*Типичные случаи ящура характеризуются наличием везикул на конечностях, слизистой оболочке щек, а также молочных железах у самок. Клинические признаки могут варьировать от слабых до сильно выраженных. Также могут наблюдаться смертельные случаи особенно у молодых животных. У некоторых видов животных инфекция может быть субклинической, например, у африканских буйволов (*Syncerus caffer*). Наиболее предпочитаемой тканью для диагностирования является эпителий из неразорвавшихся или только что разорвавшихся везикул или афтозная жидкость. Если их получение невозможно, в качестве альтернативного источника вируса берутся пробы крови и/или образцы жидкости из глотки и пищевода, отбираемой с помощью пищеводно-глоточного зонда у жвачных животных или мазки из зева у свиней. Можно использовать ткань миокарда или кровь, отобранные у павших животных, но все же, предпочтение отдается везикулам, если таковые имеются.*

*Крайне важно, чтобы транспортировка образцов, отобранных у подозрительных животных, осуществлялась безопасным способом и в соответствии с международными нормами. Их нужно отправлять исключительно в имеющие разрешение лаборатории.*

*Диагностика ящура осуществляется посредством выделения вируса или демонстрации антигена или нуклеиновой кислоты вируса ящура в образцах тканей или жидкости. Обнаружение вирус-специфических антител также может быть использовано для диагностики, а наличие антител к неструктурным белкам (NSPs) может использоваться в качестве индикатора наличия инфекции, независимо от статуса по вакцинации.*

**Идентификация возбудителя болезни:** *Для постановки положительного диагноза достаточно обнаружения антигена или нуклеиновой кислоты вируса ящура. В связи с высокой контагиозностью и экономической важностью ящура, лабораторную диагностику и идентификацию серотипа вируса необходимо производить в лабораториях, с соответствующим уровнем биозащиты, определенным по результатам анализа риска в соответствии с Главой 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Стандарт для управления биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии.*

Для обнаружения антигенов вируса ящура и серотипирования можно использовать иммуноферментный анализ (ИФА). Устройства бокового потока (LFD) становятся все более доступными и также могут использоваться для обнаружения антигенов вируса ящура. Во многих лабораториях ИФА заменил реакцию связывания комплемента (РСК), так как он обладает большей специфичностью и чувствительностью и не подвержен влиянию про- и анти- комплементарных факторов. Если количество пробы недостаточно, или диагноз остается неопределенным, материалы образца могут быть протестированы с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и/или посредством процедуры выделения вируса с использованием чувствительной культуры клеток для амплификации любой нуклеиновой кислоты или живого вируса, которые могут присутствовать в материале образца. Желательно, чтобы это была в первую очередь культура клеток цитовидной железы крупного рогатого скота (теленка), но можно также использовать клетки почек свиней, ягнят и телят, или клеточные линии с аналогичной чувствительностью. При полном проявлении цитопатогенного действия (ЦПД) в культурах, собранные жидкости можно исследовать на наличие вируса ящура, используя ИФА, РСК или ОТ-ПЦР.

**Серологические тесты:** Выявление специфических антител к структурным белкам у невакцинированных животных указывает на предшествующую инфекцию вирусом ящура. Это особенно полезно у животных с легкой формой болезни или когда нет возможности собрать эпителиальные ткани. Тесты на наличие антител к некоторым неструктурным белкам (NSPs) вируса ящура полезны для получения доказательств наличия репликации вируса в хозяине в прошлом или в настоящем, независимо от статуса по вакцинации. Неструктурные белки, в отличие от структурных белков, являются высоко консервативными и, поэтому, не являются серотип-специфическими, и, как следствие, обнаружение таких антител не является серотип-лимитированным.

Реакции нейтрализации вируса (VNT) и ИФА для обнаружения антител к структурным белкам используются в качестве серотип-специфических серологических тестов. Реакции нейтрализации вируса зависят от культур тканей и, поэтому, наиболее подвержены вариабельности, чем иммуноферментные анализы (ИФА); к тому же они медленнее и подвержены контаминации. Преимущество иммуноферментного анализа для обнаружения антител заключается в том, что он быстрее и не зависит от культуры клеток. Иммуноферментный анализ можно проводить с инактивированными или рекомбинантными антигенами, вследствие чего, требования к помещениям с системой биозащиты менее строгие.

**Требования к вакцинам:** В продаже имеются инактивированные противовирусные вакцины с различным составом. В основном, вирус используют для заражения суспензии или монослойной клеточной культуры, а получившийся в результате препарат очищают, инактивируют с помощью этиленмина и концентрируют. Для составления вакцины антиген обычно смешивают с масляным или водным адъювантом. Многие вакцины против ящура поливалентны в целях предоставления защиты от различных серотипов, или для обеспечения соответствия антигенному разнообразию, которое может встречаться в конкретной полевой ситуации.

Необходимо проводить исследование готовой вакцины на наличие остатков живого вируса. Лучшие результаты получаются при использовании in-vitro тестов на концентрированных инактивированных вирусных препаратах перед составлением вакцины, а отсутствие живого вируса впоследствии подтверждается во время проведения in-vivo и/или in-vitro тестов на готовом продукте. Также проводят тестирование посредством контрольного заражения на вакцинированном крупном

рогатом скоте (КРС), для определения 50% протективной дозы (ПД<sub>50</sub>) или на наличие защиты от системного заражения конечностей (RGP), хотя серологический тест считается удовлетворительным, если установлена достоверная корреляция между защитой и специфическим гуморальным иммунным ответом.

Предприятия по производству противоящурной вакцины должны иметь соответствующий уровень биозащиты, определенный по результатам анализа риска в соответствии с главой 1.1.4.

Диагностические и эталонные реагенты можно получить в Референтных лабораториях МЭБ по ящуру или во Всемирной референтной лаборатории ФАО по ящуру (Пербraitский институт, СК (где ФАО – Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН)).

## А. ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем ящура является вирус рода *Aphthovirus*, из семейства *Picornaviridae*. Существует семь серотипов вируса ящура, а именно, О, А, С, SAT 1, SAT 2, SAT 3 и Азия 1, которые инфицируют парнокопытных животных. Заражение одним серотипом не обеспечивает выработку иммунитета против другого серотипа. С помощью биохимических и иммунологических тестов среди серотипов можно идентифицировать множество штаммов.

Из одомашненных видов животных к ящуру восприимчивы крупный рогатый скот (КРС), свиньи, овцы, козы и буйволы (*Bubalus bubalis*) (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН [ФАО]; 1984). Возможно инфицирование многих видов диких парнокопытных животных, и вирус время от времени выделяют и у других видов животных. Было продемонстрировано, что среди семейства верблюдовых восприимчивыми являются двугорбые верблюды и верблюдовые Нового Света (Larska *et al.*, 2009). В Африке, вирусы ящура серотипов SAT часто поддерживаются африканскими буйволами (*Syncerus caffer*). Периодически происходит «перелив» инфекции на сельскохозяйственных животных или симпатрических парнокопытных диких животных. Во всем мире основным резервуаром для вирусов ящура обычно является крупный рогатый скот, хотя в некоторых случаях вовлеченные вирусы оказываются специфически адаптированными к свиньям (такие как адаптированный к свиньям штамм Cathay вируса ящура типа О) и, поэтому для первичного выделения требуются клетки свиней. Мелкие жвачные животные могут играть важную роль в распространении вируса ящура, но по-прежнему не ясно, могут ли эти виды животных обеспечивать сохранение вируса в течение длительного периода при отсутствии инфекции у крупного рогатого скота. Штаммы вируса ящура, которые инфицируют КРС, были выделены у диких свиней, антилоп и оленей. Полученные фактические данные указывают на то, что в прошлом, инфицирование оленей произошло при контакте, прямом или непрямом, с инфицированными домашними животными, и что, как выявлено, кроме африканских буйволов, дикие животные, до настоящего времени, не были способны независимо обеспечивать сохранение вирусов ящура дольше, чем в течение нескольких месяцев.

Инфекция восприимчивых животных вирусом ящура может привести к образованию везикул на конечностях, в ротовой полости и вокруг нее, а также на молочных железах у самок. Везикулы разрываются и заживают, тогда, как поражения венчика приводят к возникновению линий разделения старой и новой боковой стенки копыта. Длительность поражений может быть определена по данным изменениям, так как

они указывают на время возникновения инфекции (Министерство сельского хозяйства, рыболовства и продовольствия Соединенного Королевства; 1986). Мастит является типичным последствием ящура у молочного КРС. Везикулы могут также присутствовать на других участках, например, на внутренней поверхности ноздрей и в точках давления на конечностях – особенно у свиней. Степень тяжести клинических признаков варьирует в зависимости от штамма вируса, дозы воздействующего вируса, возраста и породы животного, вида животного-хозяина и уровня иммунитета животного. Признаки могут варьировать от инфекции со слабо выраженными признаками или бессимптомной до инфекции в тяжелой форме. В некоторых случаях может наблюдаться гибель больных животных. Смертность от многоочагового миокардита наиболее часто встречается у молодых животных: На других участках также может наблюдаться миозит.

В хозяйствах, в истории которых имеются данные о случаях внезапной гибели молодняка парнокопытных сельскохозяйственных животных, при тщательном осмотре взрослых особей, если вовлечен ящур, часто можно обнаружить наличие везикулярных поражений. Наличие везикул у павших больных животных вариабельно.

У животных, у которых в истории имеется везикулярная болезнь, обнаружение вируса ящура в образцах везикулярной жидкости, эпителиальной ткани, пищеводно-глоточном образце, молоке или крови является достаточным для постановки диагноза. Диагноз также может быть поставлен путем обнаружения вируса ящура в крови, сердце или других органах павших особей. У некоторой доли павших больных животных можно невооруженным взглядом наблюдать миокардит (так называемое «тигровое сердце»).

Вирусы ящура могут присутствовать во всех секретах и экскретах животных с острой инфекцией, включая выдыхаемый воздух. Передача обычно осуществляется при прямом контакте между инфицированными и восприимчивыми животными или, значительно реже, при подвергании восприимчивых животных непрямому воздействию экскретов и секретов животных с острой инфекцией, либо непрошедших кулинарную обработку мясопродуктов. После выздоровления от острой стадии инфекции инфекционный вирус исчезает за исключением присутствия в низких уровнях, которые могут сохраняться в ротоглотке у некоторых жвачных животных. Живой вирус или вирусную рибонуклеиновую кислоту (РНК) по-прежнему можно выделить из пищеводно-глоточной жидкости и клеток, отобранных с помощью пищеводно-глоточного зонда. Также установлено, что вирус ящура персистирует в нерепликационной форме в лимфатических узлах (Juleff *et al.*, 2008). Животные, у которых вирус персистирует в ротоглотке дольше 28 дней после инфицирования, считаются вирусоносителями. Свиньи не становятся вирусоносителями. Косвенные доказательства указывают на то, что особенно у африканских буйволов, животные-носители могут, в редких случаях, передавать инфекцию восприимчивым домашним животным, с которыми они вступают в близкий контакт: механизм такой передачи неизвестен. Состояние вирусоносительства у КРС обычно не продолжается дольше, чем 6 месяцев, хотя у небольшой доли животных, оно может сохраняться до 3 лет. У африканских буйволов отдельные особи сохраняли в себе вирус в течение не менее 5 лет, но данное явление, вероятно, не является пожизненным. В стаде буйволов, вирус может сохраняться в течение 24 лет или дольше. Овцы и козы, как правило, не являются носителями вирусов ящура дольше нескольких месяцев, при этом мало известно о длительности состояния носительства у видов и подвидов азиатских буйволов.

Считается, что ящур представляет незначительный зоонозный риск. Однако ввиду его высокой контагиозности для животных и экономической значимости ящура, все лабораторные работы с живыми вирусными культурами или потенциально

инфицированными/контаминированными материалами, такими как образцы тканей и крови, должны производиться при наличии соответствующего уровня защиты, определенного по результатам анализа биориска (см. Главу 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарт для управления биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии*). Страны, у которых нет доступа к объектам с соответствующей системой защиты, должны отправлять образцы в Референтную лабораторию МЭБ по ящуру. Предприятия по производству вакцины также должны удовлетворять данным требованиям к уровню защиты.

В Референтных лабораториях МЭБ по ящуру можно получить диагностические и стандартные реагенты в виде наборов или по отдельности. Использование инактивированных антигенов в иммуноферментном анализе (ИФА) в качестве контролей тестов по обнаружению антигенов или для реакции с тестируемой сывороткой в жидкофазном блокирующем или твердофазном конкурирующем ИФА, снижает риск недостаточного обеспечения безопасности от болезни, по сравнению с таковым, ассоциированным с использованием живого вируса. Реагенты поставляются либо в лиофилизированном виде, либо в глицерине, либо без глицерина, но в замороженном виде, и они способны оставаться стабильными при температурах от +1 до +8 , -30 до -5, -90 до -50, соответственно, в течение многих лет. В продаже имеется ряд диагностических тест-наборов для выявления антигенов вируса и антител к вирусу.

## В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

*Таблица 1. Имеющиеся методы тестирования для диагностики ящура и их цель*

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции перед перемещением	Способствует осуществлению политики искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельного животного или популяций после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>						
Выделение вируса	-	+	+++	+++	-	-
Обнаружение антигена ИФА	-	-	+++	+++	-	-
РСК	-	-	+	+	-	-
LFD	-	-	+++	+++	-	-
ОТ-ПЦР в реальном времени	+	+	+++	+++	+	-
ОТ-ПЦР	+	+	+++	+++	+	-
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
NSP Аб ИФА	+++	++	+++	+++	+++	-
SP Аб ИФА <sup>(a)</sup>	++	++	+++	+++	++	+++
PВН <sup>(a)</sup>	++	++	+++	+++	++	+++

<sup>1</sup> Рекомендуется использовать комбинацию методов идентификации при исследовании одного и того же клинического образца.

AGID	+	+	+	+	+	-
------	---	---	---	---	---	---

Пояснения: +++ = рекомендуемый метод, валидированный для указанной цели; ++ = подходящий метод, но может потребоваться дополнительная валидация; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, достоверность или другие факторы серьезно ограничивают его применение; - = не соответствует указанной цели; n/a- не применим.

ИФА = иммуноферментный анализ; РСК = реакция связывания комплемента; LFD= устройство бокового потока; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; AGID= иммунодиффузия в агаровом геле; NSP Ab ИФА = ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса; SP Ab ИФА = ИФА для обнаружения антител к структурным белкам вируса РВН- реакция вируснейтрализации

<sup>(a)</sup> Данный тест не дифференцирует инфицированных и вакцинированных животных

Для проведения лабораторной диагностики, предпочтение отдается эпителию или везикулярной жидкости. В идеале, необходимо собрать, как минимум, 1 г. эпителиальной ткани из не разорвавшейся или только что разорвавшейся везикулы, обычно с языка, со слизистой оболочки щеки или нижних конечностей. Для того чтобы во время сбора образцов избежать нанесения травм персоналу, который занимается отбором образцов, а также в целях обеспечения благополучия животных, перед взятием образца рекомендуется успокоить животных, применяя седативные средства.

Эпителиальные образцы следует поместить в транспортную среду, состоящую из равных количеств глицерина и 0,04 М фосфатного буфера, рН 7,2-7,6, предпочтительно с добавлением антибиотиков (пенициллин [1000 международных единиц (МЕ)], сульфат неомицина [100 МЕ], сульфат полимиксина В [50 МЕ], микостатин [100 МЕ]). При отсутствии 0,04 М фосфатного буфера, вместо него можно использовать среду для культивирования тканей или забуференный фосфатом солевой раствор (ЗФР), но важно, чтобы итоговый рН уровень смеси глицерин/буферный раствор находился в пределах рН 7,2-7,6. Вирус ящура чрезвычайно изменчив при низком рН, поэтому забуферивание транспортной среды крайне важно для успешного отбора образцов. Образцы, до тех пор, пока они не будут доставлены в лабораторию, следует хранить в холодильнике или на льду.

Когда невозможно получить эпителиальную ткань от жвачных животных, например, при запущенных случаях болезни или в период выздоровления, или когда имеются подозрения о наличии инфекции при отсутствии клинических признаков, можно отбирать образцы пищеводно-глоточной жидкости при помощи пищеводно-глоточного зонда (или у свиней мазок из зева) для предоставления в лабораторию с целью проведения процедуры выделения вируса или полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Во время исследования образцов сыворотки крови посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией или процедуры выделения вируса также можно обнаружить вирусемию. Для взятия мазка из зева у свиней, животное укладывают на спину на деревянное ложе и удерживают на нем с вытянутой шеей. Захватив тампон соответствующим инструментом, таким как артериальный зажим, тампон проталкивают к задней стенке ротовой полости и в глотку.

Перед сбором пищеводно-глоточных образцов у КРС или у крупных жвачных животных (например, у буйволов), 2 мл транспортной жидкости (состоящей из 0,08 М фосфатного буфера, содержащего 0,01% альбумина бычьей сыворотки, 0,002% фенолового красного, антибиотиков [100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл микостатина, 100 ед/мл неомицина и 50 ед/мл полимиксина], и доведенной до уровня рН 7,2) следует поместить в сосуд, емкостью около 5 мл, способный выдерживать заморозку на сухом льду (твердый диоксид углерода) или в жидком азоте (Kitching and Donaldson, 1987).

Отбор образцов пищеводно-глоточной жидкости производится посредством введения пищеводно-глоточного зонда над языком в ротоглоточную полость, а затем, энергичного

его перемещения вперед и назад от 5 до 10 раз между первой частью пищевода и задней частью глотки. Целью данной процедуры является сбор пищеводно-глоточной жидкости и особенно поверхностных эпителиальных клеток с этих участков, включая проксимальную часть пищевода, стенки глотки, тонзиллярные ниши и поверхности мягкого неба. Если образец не содержит необходимого количества клеточного дебриса, процедуру можно повторить.

После сбора пищеводно-глоточной жидкости с помощью зонда, содержимое чаши следует вылить в прозрачный сосуд с широким горлышком, вместительностью около 20 мл. Жидкость исследуют, и она должна содержать какое-то количество клеточного материала, видимого невооруженным глазом. Затем в эту жидкость добавляют транспортную жидкость приблизительно в таком же объеме, добиваясь переноса клеточного материала; смесь осторожно встряхивают, и её итоговый уровень pH должен составлять приблизительно 7,6. Образцы, контаминированные содержимым желудка, могут быть непригодными для культивирования. Образцы, в которых видно присутствие крови, не являются полностью приемлемыми. Повторный отбор образцов может быть произведен после ополаскивания рта и глотки животных водой или забуференным фосфатом соевым раствором. При отборе образцов от нескольких животных, необходимо производить очистку и дезинфекцию пищеводно-глоточного зонда после его использования у каждого животного. Зонд промывают водопроводной водой, погружая его в подходящее дезинфицирующее средство (например, 0.5% [вес/объем] лимонной кислоты в водопроводной воде), а затем смывают все дезинфицирующее средство водой, перед тем как данный зонд будет использован для отбора образцов у следующего животного.

Для того, чтобы собрать образцы пищеводно-глоточной жидкости у мелких жвачных животных, в сосуд с широким горлышком, вместимостью около 20 мл, помещают 2 мл транспортной жидкости, а затем, после отбора образцов зонд промывают транспортной жидкостью, чтобы слить образец пищеводно-глоточной жидкости. Затем эту смесь переливают в сосуд вместимостью около 5 мл для последующей транспортировки. Такой небольшой сосуд должен выдерживать заморозку на сухом льду или в жидком азоте (Kitching and Donaldson, 1987).

Образцы пищеводно-глоточной жидкости сразу после отбора должны быть помещены в холодильник или заморожены. Если их предстоит транспортировать дольше, чем несколько часов, то их лучше заморозить, поместив либо на сухой лед, либо в жидкий азот. Перед замораживанием емкости должны быть тщательно запечатаны либо с помощью воздухонепроницаемой навинчивающейся крышки, либо с помощью силикона. Это особенно важно при использовании сухого льда, в связи с тем, что попадание двуокси углерода (CO<sub>2</sub>) в пищеводно-глоточную жидкость понизит ее уровень pH, инактивируя любой вирус ящура, который может присутствовать в образцах. Не следует использовать стеклянные сосуды, поскольку существует риск того, что они могут взорваться при размораживании в случае попадания в них жидкого азота. Образцы необходимо доставить в лабораторию в замороженном состоянии или, если это невозможно, их перевозка должна производиться в условиях обеспечения наличия надежной холодовой цепи.

При пересылке скоропортящихся материалов с подозрением на ящур в пределах страны, так и за ее пределы, необходимо соблюдать особые меры предосторожности. Правила перевозки опасных грузов (DGR) Международной ассоциации воздушных перевозок (IATA) содержат ясные требования относительно упаковки и отправки диагностических образцов любыми видами коммерческого транспорта. Данные требования кратко изложены в Главе 1.1.2 *Отбор и отправка диагностических образцов* и Главе 1.1.3.

*Транспортировка образцов животного происхождения.* Формы и указания по доставке образцов и спецификации для изготовления пищеводно-глочочных зондов можно найти на веб-сайте Референтной лаборатории МЭБ в Пирбрайте: <http://www.wrlfmd.org/>. Процедуру отбора образцов и отправки полевых образцов для диагностики везикулярных болезней и для их дифференциальной диагностики можно найти на веб-сайте Панамериканской Референтной лаборатории МЭБ по ящуру: <http://www.panaftosa.org.br>.

## **1. Идентификация возбудителя**

С помощью процедуры выделения вируса или полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией можно исследовать различные типы образцов, включая эпителий, образцы пищеводно-глочочной жидкости, молоко и сыворотки крови. Напротив, ИФА, реакция связывания комплемента и устройство с боковым потоком подходят для исследования эпителиальных суспензий, везикулярной жидкости или супернатантов культуры клеток, но они недостаточно чувствительны для прямого исследования образцов пищеводно-глочочной жидкости или сыворотки крови.

### **1.1 Выделение вируса**

Эпителиальные образцы следует извлечь из забуференного фосфатом солевого раствора/глицерина, высушить, нанеся на фильтровальную бумагу для уменьшения содержания глицерина, токсичного для клеточных культур, и взвесить. Необходимо приготовить суспензию, размельчив образец в стерильном песке при помощи стерильного пестика и в стерильной ступке с небольшим количеством среды для культивирования тканей и антибиотиков. Затем следует еще добавлять среду до тех пор, пока итоговый объем не будет в 9 раз превышать объем образца эпителия, получив 10% суспензию. Данную суспензию центрифугируют в настольной центрифуге при 2000 *g* в течение 10 минут. После центрифугирования такие суспензии полевых образцов, в отношении которых существуют подозрения, что они содержат вирус ящура, инокулируют на культуры клеток. Чувствительные культуры клеток включают первичные клетки бычьей (телячьей) щитовидной железы и первичные клетки почек свиней, телят и ягнят. Также можно использовать стабильные клеточные линии, такие как клетки ВНК-21 (почки новорожденного хомяка) и IB-RS-2, но они обычно менее чувствительны, чем первичные клетки для обнаружения низких уровней инфекционности. Чувствительность любых используемых клеток должна быть протестирована с использованием стандартных препаратов вируса ящура. Использование IB-RS-2 помогает дифференцировать вирус везикулярной болезни свиней (SVDV) и вирус ящура (так как вирус везикулярной болезни свиней растет только в клетках свиного происхождения) и часто необходимо для выделения свиных штаммов, таких как O Cathay. Культуры клеток необходимо исследовать на наличие цитопатогенного действия (ЦПД) в течение 48 часов. Если ЦПД не выявлено, клетки следует заморозить и оттаять, инокулировать в свежие культуры и исследовать еще раз на наличие ЦПД в течение других 48 часов. Если это пищеводно-глочочные жидкости, предварительная обработка пищеводно-глочочной жидкости равным количеством хлорфторуглеродами, повышает вероятность обнаружения вируса, путем высвобождения вируса из иммунных комплексов.

### **1.2. Иммунологические методы**

#### **1.2.1. Иммуноферментный анализ (ИФА)**

Иммуноферментный анализ является предпочтительным методом для обнаружения антигена вируса ящура и идентификации вирусного серотипа (Ferris & Donaldson, 1992; Roeder & Le Blanc Smith, 1987). Это - непрямой сэндвич-тест, при проведении которого различные ряды в многолуночных планшетах сенсibiliзируют кроличьими антисыворотками к каждому из семи серотипов вируса ящура. Они представляют собой сыворотки крови «для захвата». Тестируемые образцы суспензии добавляют в каждый ряд, а также включают соответствующие контроли. Затем добавляют антисыворотки морских свинок к каждому из серотипов вируса ящура, после чего добавляют кроличью сыворотку против глобулинов морской свинки, конъюгированную с ферментом. После каждой стадии производят экстенсивное промывание, для удаления несвязанных реагентов. Цветная реакция при добавлении субстрата фермента и хромогена указывает на положительную реакцию. При интенсивных положительных реакциях это будет видно невооруженным глазом, однако можно также произвести спектрофотометрическое считывание результатов при соответствующей длине волны. В этом случае, показатель оптической плотности выше фонового, чем 0.1, указывает на наличие положительной реакции; также можно идентифицировать серотип вируса ящура. Значения, близкие к 0.1 следует подтверждать при помощи повторного тестирования или амплификации антигена с помощью пассирования культуры ткани и тестирования супернатанта после развития ЦПД. Подходящая процедура исследования приведена ниже. Имеются другие процедуры с несколько отличными форматами и критериями интерпретации (Alonso *et al.*, 1993).

В зависимости от пораженных видов животных и географического происхождения образцов, возможно, целесообразно проводить параллельное тестирование на наличие вируса везикулярной болезни свиней (SVDV) или вируса везикулярного стоматита (VSV). В идеале, полную дифференциальную диагностику следует проводить при всех везикулярных состояниях.

Кроличья антисыворотка к 146S антигену каждого из семи серотипов вируса ящура (и, если необходимо, вируса SVD или вируса VSV) используется в качестве захватывающего антитела в заранее определенной оптимальной концентрации в карбонатном/бикарбонатном буфере, pH 9,6.

Контрольные антигены получают из отобранных штаммов каждого из семи серотипов вируса ящура (плюс, в случае необходимости, вируса SVD или вируса VSV), выращенных в монослойных культурах ВНК-21 клеток (IB-RS-2 клеток для SVDV или VSV). Используют неочищенные супернатанты и проводят их предварительное титрование на ИФА планшетах. Выбранное конечное разведение представляет собой разведение, которое дает абсорбцию в наивысшей точке линейной области титрационной кривой (оптическая плотность приблизительно 2.0), таким образом, чтобы пятикратные разведения контрольных антигенов, использованных в тесте, давали два дополнительных более низких показателя оптической плотности при считывании, которые можно использовать для получения титрационной кривой.. Забуференный фосфатом солевой раствор (ЗФР), содержащий 0,05% Твин 20 феноловый красный индикатор, используют в качестве разбавителя (PBST).

Антисыворотка морской свинки, полученная путем прививки морских свинок 146S антигеном одного из семи серотипов вируса ящура (плюс, если необходимо, вируса SVD или вируса VSV) и предварительно блокированная нормальной бычьей сывороткой (NBS), используется для выявления антител. Предварительно определенные оптимальные концентрации получают в ЗФР, содержащем 0,05% Твин 20 и 5% сухое обезжиренное молоко (PBSTM).

Кроличий (или овечий) иммуноглобулин против глобулинов морской свинки, конъюгированный с пероксидазой хрена и предварительно блокированный нормальной бычьей сывороткой (NBS), используется в заранее установленной оптимальной концентрации в PBSTM. В качестве альтернативы кроличьей антисыворотки и антисыворотки морской свинки, можно использовать подходящие моноклональные антитела (Mabs), которые используют для сенсibilизации планшетов для ИФА, в качестве захватывающего антитела или используют в конъюгированном с пероксидазой виде в качестве детекционного антитела. Имеется валидированный готовый к использованию набор на основе предварительно отобранных моноклональных антител для обнаружения и серотипирования шести из семи серотипов вируса ящура.

### 1.2.2. Процедура анализа

- i) Сенсibilизировать ИФА планшеты с помощью кроличьей антивирусной сыворотки крови в 0,05 М карбонатном/бикарбонатном буфере, pH 9,6, по 50 мкл в каждую лунку. В ряды от А до Н добавляют, соответственно, антисыворотки к серотипам О, А, С, SAT 1, SAT 2, SAT 3, Азия 1 и SVDV или VSV (по усмотрению). В странах, расположенных в регионах, где серотипы SAT и Азия-1 никогда не циркулировали, эти серотипы при рутинном исследовании не включают.
- ii) Оставить на ночь при температуре 4°C в стационарном положении или поместить в орбитальный шейкер, установленный на 100-120 вращений в минуту при 37°C на один час.
- iii) Приготовить суспензию тест-образца (10% суспензия исходного образца или неразбавленная осветленная надосадочная жидкость клеточной культуры).
- iv) ИФА планшеты промыть пять раз с помощью ЗФР.
- v) На каждом планшете наполнить лунки колонок 4, 8, и 12 50 мкл PBST. Кроме того, добавить 50 мкл PBST в лунки 1, 2 и 3 рядов А-Н на планшете 1. В лунку 1 ряда А на планшете 1 добавить 12,5 мкл контрольного антигена типа О, в лунку 1 ряда В добавить 12,5 мкл контрольного антигена типа А; продолжить таким же образом для контрольного антигена типа С, SAT 1, SAT 2, SAT 3, Азия 1 и SVDV или VSV (если целесообразно) по порядку с лунки 1, рядов С-Н. Перемешать разбавитель в лунке 1 рядов А-Н и перенести 12,5 мкл из лунки 1 в лунку 2 (рядов А-Н), перемешать и перенести 12,5 мкл из лунки 2 в лунку 3, перемешать и удалить 12,5 мкл из лунки 3 (ряды А-Н) (это дает серию пятикратных разведений каждого контрольного антигена). Необходимо только менять наконечники пипеток на микропипетке при переходе от одного антигена к другому. Остальная часть планшета может быть заполнена тест-образцом(-ми). Добавить 50 мкл

первого образца в лунки 5, 6 и 7 рядов А-Н, второй образец аналогично разместить в колонках 9, 10 и 11, рядов А-Н.

Если одновременно тестируются больше двух образцов, нужно использовать другой планшет для ИФА следующим образом:

Распределить по 50 мкл PBST в лунки (ряды А-Н) колонок 4, 8 и 12 (колонок контроля буфера). Обратите внимание, что использование контрольных антигенов на этих планшетах не требуются. Данные тест-образцы можно добавлять в объеме 50 мкл в лунки рядов от А до Н колонок 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, соответственно.

- vi) Накрыть крышкой и поместить в орбитальный шейкер при 37°C на один час.
- vii) Промыть планшеты, наполняя из ЗФР – промыть три раза и затем вылить остатки промывочной жидкости. Промокнуть планшеты до сухого состояния.
- viii) Перенести объем в 50 мкл каждого разведения сыворотки крови морской свинки в каждую лунку планшета в соответствующем порядке, например, в ряды А-Н помещают, соответственно, антисыворотки к серотипам О, А, С, SAT 1, SAT 2, SAT 3, Азия 1 и SVDV или VSV (по усмотрению).
- ix) Накрыть планшеты крышкой и поместить в орбитальный шейкер. Инкубировать в течение часа при 37°C.
- x) Планшеты снова промыть три раза, и в каждую лунку добавить 50 мкл кроличьего иммуноглобулина против глобулинов морской свинки, конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшеты инкубируют в течение часа при 37°C в ротационном шейкере.
- xi) Планшеты снова промыть три раза, и в каждую лунку добавить 50 мкл раствора субстрата, содержащего 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> плюс ортофенилендиамин или подходящий альтернативный хромоген.
- xii) Произвести остановку реакции через 15 минут посредством добавления 50 мкл 1,25 М серной кислоты. Планшеты считывать при длине волны 492 нм на спектрофотометре, присоединенным к компьютеру.

### **1.2.3. Тест с использованием устройств с боковым потоком**

В продаже имеются устройства с боковым потоком (LFD) для обнаружения антигенов вируса ящура (Ferris *et al.*, 2009), но МЭБ еще не получило валидационное досье для этих тестов. Как только досье будет получено, производитель может подать заявку о включении их в реестр тестов МЭБ.

### **1.2.4. Реакция связывания комплемента (РСК)**

В целом, предпочтительным является ИФА, а не РСК, потому что он наиболее чувствителен и не подвержен воздействию про- или анти- комплементарных факторов (Ferris & Dawson, 1988). Если ИФА реагенты не доступны, или если

необходимо провести субтипирование, можно провести РСК следующим образом:

Протокол проведения РСК50% в пробирках, широко используется в Южной Америке для типирования, субтипирования и для определения серологического родства (r-показатель), и осуществляется следующим образом: 0,2 мл антисыворотки к каждому серотипу вируса ящура, разведенной до заранее определенного оптимального разведения в разбавителе в виде вероналового буфера (VBD) или в борат-солевом растворе (BSS), помещают в отдельные пробирки. К полученному раствору добавляют 0,2 мл суспензии тест-образцов, а затем 0,2 мл разведения комплемента, содержащего 4 единицы комплемента. Данную тест-систему инкубируют при 37°C в течение 30 минут, а затем добавляют 0,4 мл 2% стандартизированных эритроцитов барана (SRBC) в VBD или BSS, сенсibilизированных кроличьими анти-SRBC. Реагенты инкубируют при 37°C в течение еще 30 минут, и пробирки впоследствии центрифугируют и считывают. Образцы с гемолизом менее 50% считаются положительными.

Имеются и используются другие протоколы, где исследование проводится на микропланшетах следующим образом: антисыворотки к каждому из семи типов вируса ящура разбавляют вероналовым буфером (VBD) с шагом в 1,5 кратное разведение, начиная с первоначального 1/16 разведения, чтобы оставить 25 мкл последовательных разведений антисыворотки в U-образных лунках от края до края титрационного микропланшета. В них добавляют 50 мкл трех единиц комплемента, а затем 25 мкл суспензии(-зий) тест образца(-ов). Данную тест-систему инкубируют при 37°C в течение 1 часа, затем добавляют 25 мкл 1,4% стандартизированных бараньих эритроцитов (SRBC) в вероналовом буферном растворе (VBD), сенсibilизированных с помощью 5 единиц кроличьих анти-SRBC. Реагенты инкубируют при 37°C в течение следующих 30 минут, планшеты впоследствии центрифугируют и считывают. Включают соответствующие контроли для тестируемой суспензии(-зий), антисывороток, клеток и комплемента. РСК титры выражают в виде величины, обратной разведению сыворотки, продуцирующему 50% гемолиз. РСК титр, составляющий  $\geq 36$ , считается положительной реакцией. Значение титра, эквивалентное 24, следует подтверждать повторным тестированием антигена, который был амплифицирован посредством пассирования в культуре ткани.

### **1.3. Методы обнаружения нуклеиновых кислот**

ОТ-ПЦР может быть использована для амплификации фрагментов генома вируса ящура в диагностических материалах, включая эпителий, молоко, сыворотку крови и пищеводно-глоточные образцы. ОТ-ПЦР обладает чувствительностью, сопоставимой с таковой процедуры выделения вируса, а автоматизированные процедуры повышают количество обрабатываемых образцов (Reid *et al.*, 2003). Также разработаны праймеры для серотипирования (Vangrysterpe & De Clerq, 1996). В процессе разработки находятся упрощенные ОТ-ПЦР системы для потенциального использования в полевых условиях (Callahan *et al.*, 2002).

#### **1.3.1. ОТ-ПЦР анализ с электрофорезом в агарозном геле**

Описана процедура ОТ-ПЦР с электрофорезом в агарозном геле (Reid *et al.*, 2000). Данный ОТ-ПЦР анализ состоит из трех следующих друг за другом процедур: (i) экстрагирование матричной рибонуклеиновой кислоты (РНК) из

тестируемого или контрольного образца с последующей (ii) ОТ экстрагированной РНК, (iii) ПЦР амплификацией ОТ продукта и (iv) обнаружением ПЦР продуктов с помощью электрофореза в агарозном геле.

### 1.3.2. Процедура анализа

- i) Добавить 200 мкл тестируемого образца к 1 мл реагента для экстрагирования РНК в стерильной пробирке. Хранить при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  до тех пор, пока не потребуется для экстрагирования РНК.
- ii) Перенести 1 мл раствора из i) в неиспользованную, стерильную пробирку, содержащую 200 мкл хлороформа. Перемешивать на вортексе около 10-15 секунд и оставить при комнатной температуре на 3 минуты.
- iii) Центрифугировать в течение 15 минут при 20 000 g.
- iv) Перенести 500 мкл водной фазы в неиспользованную, стерильную пробирку, содержащую 1 мкл гликогена (20 мг/мл) и добавить 500 мкл изопропилового спирта (пропан-2-ол). Перемешивать на вортексе в течение нескольких секунд.
- v) Оставить при комнатной температуре на 10 минут, затем подвергнуть центрифугированию в течение 10 минут при 20 000 g.
- vi) Слить из каждой пробирки супернатант и добавить 1 мл 70% этилового спирта. Перемешивать на вортексе в течение несколько секунд.
- vii) Центрифугировать в течение 15 минут при 20 000 g.
- viii) Осторожно слить супернатант из каждой пробирки, стараясь не сместить и не утратить осадок после центрифугирования на дне пробирки.
- ix) Высушить на воздухе каждую пробирку при комнатной температуре в течение 2-3 минут.
- x) Ресуспендировать каждый осадок, добавляя в пробирки 20 мкл воды, не содержащей нуклеазу.
- xi) Хранить экстрагированные образцы РНК на льду, если этап ОТ будет проводиться в ближайшее время. В противном случае, хранить при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**ПРИМЕЧАНИЕ:** В качестве альтернативы фенолу/хлороформу экстрагирование РНК можно проводить, используя имеющиеся в продаже наборы на основе лизиса хаотропными солями и аффинности РНК к кремнию.

- xii) Для каждого образца, подлежащего анализу, добавляют 2 мкл произвольных гексамеров (20 мг/мл) и 5 мкл не содержащей нуклеазы воды в стерильную 0.05 мл центрифужную микропробирку. Рекомендуется готовить разведение в большом объеме для всего количества образцов, подлежащих анализу, плюс еще для одного дополнительного образца.

xiii) Добавить 5 мкл РНК, полученной при проведении процедуры экстрагирования, описанной выше, до получения в каждой пробирке объема в 12 мкл. Аккуратно смешать посредством пипетирования вверх/вниз.

xiv) Инкубировать при температуре 70°C в течение 5 минут.

xv) Остудить при комнатной температуре в течение 10 минут.

xvi) В течение 10-минутного инкубационного периода, подготовить ОТ реакционную смесь, описанную ниже, для каждого образца. Приготовить данную реакционную смесь в большом объеме в стерильной 1,5 мл центрифужной микропробирке для всего количества образцов, подлежащих анализу, плюс еще для одного дополнительного образца.

Буфер для синтеза первой цепи, 5x конц. (4 мкл); альбумин бычьей сыворотки (ацелированный), 1 мг/мл (2 мкл); dNTPs, 10 mM смеси каждой из dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 мкл); DTT, 1 M (0.2 мкл); обратная транскриптаза вируса мышинного лейкоза Молони, 200 Е/мкл (1 мкл).

xvii) Добавить 8 мкл реакционной смеси к 12 мкл произвольного праймера/РНК смеси. Перемешать посредством осторожного пипетирования.

xviii) Инкубировать при 37°C в течение 45 минут.

xix) Хранить ОТ продукты на льду, если ПЦР амплификация будет проводиться в ближайшее время, в другом случае, хранить при температуре -20°C.

xx) Приготовить ПЦР смесь, описанную ниже, для каждого образца. Рекомендуется готовить смесь в большом объеме для того количества проб, которое подлежит тестированию, плюс один дополнительный образец.

Вода, не содержащая нуклеаз (35 мкл); ПЦР реакционный буфер, 10x конц. (5 мкл); MgCl<sub>2</sub>, 50 mM (1.5 мкл); dNTPs, 10 mM смесь каждой из dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 мкл); праймер 1, 10 пмоль/мкл (1 мкл); праймер 2, 10 пмоль/мкл (1 мкл); *Taq*-полимераза, 5 единиц/мкл (0.5 мкл).

xxi) Добавить 45 мкл ПЦР реакционной смеси в лунку ПЦР планшета или центрифужную микропробирку для каждого образца, подлежащего анализу, а затем 5 мкл ОТ продукта до получения итогового реакционного объема в 50 мкл.

xxii) Вращать планшеты и пробирки в течение 1 минуты в подходящей центрифуге для перемешивания содержимого каждой лунки.

xxiii) Поместить планшеты в термоциклер для ПЦР амплификации и прогнать по следующей программе:

94°C в течение 5 минут: 1 цикл;

94°C в течение 1 минуты, 55°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 2 минут:  
30 циклов;  
72°C в течение 7 минут: 1 цикл.

Возможно, будет необходимо оптимизировать временные периоды и температуры для конкретных ферментов, реагентов и ПЦР оборудования, используемых в отдельных лабораториях.

xxiv) Смешать 20 мкл аликвоты каждого ПЦР реакционного продукта с 4 мкл окрашивающего раствора и нанести на 1,5% агарозный гель. После электрофореза, положительным результатом считается присутствие полосы, шириной 328 п.н., соответствующей последовательности вируса ящура в 5' нетранслируемой области генома.

### 1.3.3. Исходные растворы

- i) В продаже имеются вода, не содержащая от нуклеаз, реагент для экстрагирования РНК, хлороформ, гликоген, изопропиловый спирт (пропан-2-ол), этиловый спирт, случайные гексануклеотидные праймеры, буфер для синтеза первой цепи, альбумин бычьей сыворотки (ацетилированный), dNTPs, DTT, обратная транскриптаза вируса мышинного лейкоза Молони, ПЦР реакционный буфер ( $10^x$ ),  $MgCl_2$  и *Taq*-полимераза.
- ii) Праймеры в концентрации 10 пмоль/мкл: последовательность Праймера 1 5'-GCCTG-GTCTT-TCCAG-GTCT-3' (положительная цепь); последовательность Праймера 2 5'-CAGT-CCCCT-TCTCA-GATC-3' (отрицательная цепь).

### 1.3.4. Анализ методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Для анализа методом ОТ-ПЦР в реальном времени можно использовать те же процедуры экстрагирования полной РНК из тестируемого или контрольного образца с последующей обратной транскрипцией экстрагированной РНК, как для традиционной процедуры на основе электрофореза в агарозном геле. Автоматическое экстрагирование всей нуклеиновой кислоты из образцов с последующими автоматизированными программами пипетирования для этапов ОТ и ПЦР (Reid *et al.*, 2003), можно использовать в качестве альтернативы описанным выше процедурам, осуществляемым вручную. ПЦР амплификация ОТ продукта производится различными методами. Также был описан более простой одноэтапный метод для объединения этапов ОТ и ПЦР (Shaw *et al.*, 2007), и он широко используется лабораториями. После амплификации в реальном времени обнаружения ПЦР продуктов в агарозном геле не требуется.

- i) Взять ОТ продукты из этапа 19 (см. выше).
- ii) Подготовить смесь для ПЦР, описанную ниже, для каждого образца. Снова рекомендуется подготовить смесь в большом объеме для того количества образцов, которые подлежат тестированию, плюс один дополнительный образец: вода, не содержащая нуклеаз (6 мкл); ПЦР мастер-микс,  $2^x$  конц. (12.5 мкл); прямой праймер для ПЦР в реальном времени, 10 пмоль/мкл (2.25 мкл); обратный праймер ПЦР в реальном времени 10 пмоль/мкл (2.25 мкл); меченный зонд, 5 пмоль/мкл (1 мкл).

- iii) Для каждой пробы, подлежащей анализу, в лунку планшета для ПЦР в реальном времени добавить 24 мкл ПЦР реакционной смеси, а затем 1 мкл ОТ продукта до получения итогового реакционного объема 25 мкл.
- iv) Центрифугировать планшет в течение 1 минуты в подходящей центрифуге для перемешивания содержимого каждой лунки.
- v) Поместить планшет в машину ПЦР в реальном времени для ПЦР амплификации и прогнать по следующей программе:
  - 50°C в течение 2 минут: 1 цикл;
  - 95°C в течение 10 минут, 1 цикл;
  - 95°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 1 минуты: 50 циклов.

Возможно, будет необходимо оптимизировать временные периоды и температуры для конкретных ферментов, реагентов и ПЦР оборудования, используемых в отдельных лабораториях.

- vi) *Считывание результатов:* Для каждой ПЦР реакции нужно определить величину порогового цикла, исходя из кривых амплификации (кривая сигнала флюоресценции относительно количества циклов; возможно для разных типов образцов будут уместны разные точки разделения; Parida *et al.*, 2007). Отдельным лабораториям, используя соответствующие эталонные материалы, следует определять величины порогового цикла (Ct), используемые для классификации образцов, как положительных или отрицательных по наличию вируса ящура. Например, в Референтной лаборатории МЭБ в Пирбрайте, отрицательные тестируемые образцы и отрицательные контроли должны иметь показатель порогового цикла (Ct) >50.0. Положительные тестируемые образцы и положительные контроли должны иметь показатель порогового цикла (Ct) <40. Образцы с показателями порогового значения, находящимися в пределах 40-50, обозначаются как «пограничные» и могут быть протестированы повторно. Сильно положительные в отношении ящура образцы имеют значение порогового цикла ниже 20.0 (Reid *et al.*, 2001).

### 1.3.5. Исходные растворы для анализа методом ПЦР в реальном времени

- i) У коммерческих поставщиков можно приобрести воду, не содержащую нуклеаз, и мастер-миксы для ПЦР в реальном времени.
- ii) Для ПЦР в реальном времени на наличие вируса ящура можно использовать любой из следующих праймеров или наборов зондов:

5'UTR (Reid *et al.*, 2001) Прямой праймер: CACYT-YAAGR-TGACA-YTGRT-ACTGG-TAC; Обратный праймер: CAGAT-YCCRA-GTGWC-ICITG-TTA и меченный зонд: CCTCG-GGGTA-CCTGA-AGGGC-ATCC.

3D (Callahan *et al.*, 2002) Прямой праймер: ACTGG -TTTT-ACAAA-CCTGT-GA; Обратный праймер: GCGAG-TCCTG-CCACG-GA и меченный зонд: TCCTT-TGCAC-GCCGT-GGGAC.

### 1.3.6. Молекулярная эпизоотология

Молекулярная эпизоотология ящура основана на сопоставлении генетических различий между вирусами. Опубликованы дендограммы, демонстрирующие геномное родство между вакцинными и полевыми штаммами по всем семи серотипам на основании последовательностей, полученных из гена 1D (кодирующего VP1 вирусный белок) (Knowles & Samuel, 2003; см. также <http://www.wrlfmd.org/>). Сравнение полногеномных последовательностей делает возможной дальнейшую дифференциацию между близкородственными вирусами и помогает воссоздать пути передачи между фермами в зонах вспышек (Cottam *et al.*, 2008). В настоящее время предпочтительным способом получения данных о последовательности для проведения таких сравнений является ОТ-ПЦР амплификация РНК вируса ящура с последующим нуклеотидным секвенированием. Во многих лабораториях разработаны методы для проведения таких исследований, а в референтных лабораториях имеются базы данных, содержащие свыше 6000 частичных последовательностей.

Рекомендуемый метод для анализа VP1 является следующим:

- i) Экстракция РНК вируса ящура непосредственно из суспензий эпителия или из материала низкого пассажа в культуре клеток.
- ii) Осуществление ОТ-ПЦР полного 1D гена (при наличии только части 1D гена полезнее всего использовать 3'концевой сегмент данного гена).
- iii) Определение последовательности нуклеотидов ПЦР продукта (или, как минимум, 170 нуклеотидов [предпочтительно 420 для SAT типов] на 3'концевом сегменте данного гена).

Имеется протокол исследования вместе с последовательностями праймеров (Knowles *et al.*, 2016), или его можно скачать со следующих ресурсов всемирной сети:

<http://www.wrlfmd.org/>

<http://bvs.panaftosa.org.br/>

## 2. Серологические тесты

Серологические тесты на наличие ящура проводят для достижения 4 главных целей, а именно: 1) сертификация отдельных животных перед импортом и экспортом (например, в целях торговли); 2) подтверждение подозрительных в отношении ящура случаев; 3) доказательство свободы от инфекции; 4) демонстрация эффективности вакцинации. Для доказательства свободы от инфекции необходимо использовать различные подходы в зависимости от того, была ли или нет вакцинирована популяция, или, если применялась вакцинация, проводилась ли она в качестве вынужденной меры или как часть постоянной программы вакцинации. Исходя из вышеуказанных целей, целесообразно использовать различные тесты и различные интерпретации результатов теста, а при валидации выбранной процедуры необходимо учитывать цель исследования. Например, точки разделения в тестах с целью серологического надзора на уровне стада могут устанавливаться на пороговом уровне, который отличается от такового, который считается надлежащим для сертификации свободы от инфекции для отдельных животных в целях международной торговли.

Существует два вида серологических тестов на наличие ящура; тесты для обнаружения антител к структурным белкам вируса (SP) и тесты для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса (NSPs).

SP тесты являются довольно серотип-специфическими и выявляют антитела, индуцируемые вакцинацией и инфекцией; например, это такие тесты как: реакция нейтрализации вируса (VNT) (Golding *et al.*, 1976), твердофазный конкурентный ИФА (SPCE; Brocchi *et al.*, 1990; Chenard *et al.*, 2003; Mackay *et al.*, 2001; Paiba *et al.*, 2004) и жидкофазный блокирующий ИФА (LPBE; Hamblin *et al.*, 1986; 1987). Эти тесты являются высоко чувствительными при условии, что вирус или антиген, используемый в тесте, имеет высокую степень соответствия со штаммом, циркулирующим в полевых условиях. Это – тесты, используемые для сертификации животных перед их перемещением, включая таковое в целях международной торговли, и подходят для подтверждения предыдущей или имеющейся инфекции у невакцинированных животных, а также для мониторинга уровня иммунитета, индуцированной вакцинацией в полевых условиях. Для проведения реакции нейтрализации вируса необходимо оборудованное помещение для клеточного культивирования, в данной реакции используется живой вирус, и для получения результатов требуется 2-3 дня. Блокирующий или конкурентный ИФА, в которых используются серотип-специфические поликлональные антитела (PAbs) или моноклональные антитела (MAbs), более быстрый и не зависит от систем культивирования тканей и использования живых вирусов. При использовании небольшого количества сывороток крови в любом из этих ИФА можно ожидать получения ложноположительных реакций с низким титром. При использовании подхода, который совмещает скрининг посредством ИФА и подтверждение положительных реакций посредством реакции нейтрализации вируса, вероятность получения ложноположительных результатов сводится к минимуму. В Референтной лаборатории в Пирбрайте имеются эталонные сыворотки для стандартизации серологических SP тестов на наличие ящура для некоторых серотипов и подтипов ящура.

Обнаружение антител к неструктурным белкам (NSP) вируса ящура может быть использовано для идентификации прошлой или текущей инфекции любым из семи серотипов вируса, независимо от того было ли животное ранее вакцинировано или нет. Поэтому, данные тесты могут быть использованы для подтверждения случаев подозрения на ящур, и для оценки превалентности инфекции или для доказательства свободы от инфекции на популяционном уровне. Данные тесты обладают преимуществом при их использовании для сертификации животных для торговли, по сравнению с SP методами поскольку необязательно знать серотип вируса. Однако существуют экспериментальные данные, что некоторых особей КРС, вакцинированных или впоследствии контрольно зараженных живым вирусом, и у которых было подтверждено наличие персистентной инфекции, можно и не выявить при исследовании с помощью некоторых тестов на наличие антител к неструктурным белкам, что приводит к получению ложноотрицательных результатов (Brocchi *et al.*, 2006). Подобные анализы позволяют определить количество антител к неструктурным белкам, используя антигены, получаемые с помощью рекомбинантных методов в разнообразных системах экспрессии *in-vitro*. Антитела к полипротеинам ЗАВ или ЗАВС обычно считаются наиболее достоверным индикатором инфекции (Mackay *et al.*, 1997). Наличие у серопозитивных по антителам к ЗАВ или ЗАВС животных антител к одному или нескольким другим неструктурным белкам может помочь при проведении итоговой интерпретации результатов теста (Bergman *et al.*, 2000; Mackay *et al.*, 1997). Однако недостаточная чистота вакцины может оказывать негативное влияние на диагностическую специфичность, поскольку наличие неструктурных белков в некоторых вакцинных

препаратах может привести к неправильной классификации животных, которые были вакцинированы повторно. Методы по определению чистоты вакцины описаны в разделе D этой главы.

В Референтных лабораториях МЭБ в Бразилии и Соединенном Королевстве были созданы международные стандартные сыворотки крови для тестирования КРС, их можно получить в данных лабораториях (Campos *et al.*, 2008). В будущем, также будут созданы стандартные сыворотки крови для овец и свиней. Для сравнительного анализа чувствительности NSP тестов были созданы наборы сывороток крови КРС (Parida *et al.*, 2007).

## **2.1. Реакция нейтрализации вируса**

Количественная микрореакция нейтрализации вируса на наличие антител к вирусу ящура осуществляется с использованием IB-RS-2, ВНК-21, клеток почек ягнят и свиней на плоскодонных титрационных микропланшетах для культивирования тканей.

Исходный вирус выращивают в клеточных монослоях и хранят при температуре -20°C после добавления 50% глицерина. (Выявлено, что вирус стабилен в таких условиях в течение, как минимум, одного года). Перед тестированием сыворотки крови инактивируют при температуре 56°C в течение 30 минут. Контрольная стандартная сыворотка крови представляет собой сыворотку крови, отобранную на 21 день выздоровления или после вакцинации. Подходящей средой является полная среда Игла/LYN (сбалансированный солевой раствор Хэнкса с дрожжами, гидролизатом лактальбумина) с HEPES буфером и антибиотиками.

Тест является тестом, проводимым с равными объемами по 50 мкл.

### **2.1.1. Процедура теста**

- i) Начиная с  $\frac{1}{4}$  разведения, сыворотки крови разводят двукратно, серия разведений по всему планшету, используя, как минимум, два ряда лунок для одной сыворотки крови, предпочтительно четыре ряда, и объем в 50 мкл.
- ii) Добавляют предварительно титрованный вирус; каждая единица объема суспензии вируса в 50 мкл должна содержать около 100 TCID<sub>50</sub> (50% доза, инфицирующая культуру ткани) в допустимом диапазоне (например, 32-320 TCID<sub>50</sub>).
- iii) Контроли включают стандартную антисыворотку с известным титром, контроль клеток, контроль среды, и титрование вируса для вычисления фактического титра вируса, используемого в данном тесте.
- iv) Покрытые планшеты инкубируют при 37°C в течение часа.
- v) Клеточную суспензию плотностью  $10^6$  клеток/мл готовят в среде, содержащей 10% бычьей сыворотки (не содержащую специфических антител) для клеточного роста. В каждую лунку добавляют клеточную суспензию объемом в 50 мкл.

- vi) Планшеты герметично запечатывают самоклеющейся лентой и инкубируют при температуре 37°C в течение 2-3 дней. В качестве альтернативы, планшеты можно покрыть неплотно прилегающими крышками и инкубировать в атмосфере с 3-5% углекислым газом при 37°C в течение 2-3 дней.
- vii) Микроскопическое считывание возможно спустя 48 часов. На третий день планшеты в заключение фиксируют и, рутинно окрашивают. Фиксацию производят с помощью 10% формальдегида/солевого раствора в течение 30 минут. Для окрашивания планшеты погружают в 0,05% метиленовый синий в 10% формалине на 30 минут. Альтернативным фиксатором/окрашивающим раствором является раствор сине-черного нафталина (0,4% [вес/объем] сине-черный нафталин, 8% [вес/объем] лимонная кислота в солевом растворе). Планшеты промывают в водопроводной воде.
- viii) В лунках с положительной реакцией (где вирус нейтрализован и клетки остались неповрежденными) наблюдается присутствие окрашенных в синий цвет клеточных слоев; лунки с отрицательной реакцией (где вирус не был нейтрализован) пусты. Титры выражают в виде конечного разведения сыворотки крови, присутствующей в смеси сыворотка/вирус, где 50% лунок защищены (Kärber, 1931). Результаты теста считаются достоверными, если количество вируса, использованного в одной лунке, находится в диапазоне  $\log_{10}$  1,5-2,5 TCID<sub>50</sub>, а показатель положительной стандартной сыворотки крови - в пределах двукратного значения её ожидаемого титра.
- ix) Интерпретация результатов тестов может варьировать в зависимости от порогового значения точки разделения положительных/отрицательных результатов Лаборатории должны установить свои собственные критерии, сверяясь со стандартными реагентами, которые можно получить из Референтной лаборатории МЭБ в Пирбрайте. Как правило, титр конечного разведения сыворотки крови в смеси сыворотка/вирус, равный 1/45 или выше, считается положительными. Титр меньше 1/16 считается отрицательным. Для сертификации отдельных животных в целях международной торговли, титры от 1/16 до 1/32 считаются сомнительными, и могут быть запрошены дополнительные образцы сыворотки крови для тестирования, результаты считаются положительными, если второй образец имеет титр 1/16 или выше. При проведении серологического надзора на уровне стада, как части статистически достоверного серологического исследования, возможно соответствующим значением точки разделения будет 1/45. Титры точки разделения для оценки степени иммунологической защиты, предоставляемой вакцинацией, следует устанавливать исходя из опыта по получению результатов теста на иммуногенность при использовании релевантной вакцины и целевых видов животных.

## 2.2. Твердофазный конкурентный иммуоферментный анализ

Описанный метод (Paiba *et al.*, 2004) может быть использован для обнаружения антител к каждому из семи серотипов вируса ящура. В качестве альтернативы антисывороткам морской свинки или кролика, можно использовать подходящие моноклональные антитела, которыми сенсibiliзируют ИФА планшеты, в качестве

захватывающих антител, или которые конъюгированы с пероксидазой в качестве детекторных антител (Broschi *et al.*, 1990). Имеются коммерческие наборы на базе моноклональных антител для серотипа О (Chenard *et al.*, 2003), серотипа А, серотипа Азия-1 и серотипа SAT2 в различных форматах, но со схожими рабочими характеристиками.

Кроличья антисыворотка к 146S антигену одного из семи типов вируса ящура используется в качестве захватывающего антитела в заранее установленной оптимальной концентрации в карбонатном/биокарбонатном буфере, pH 9,6.

Антигены получают посредством инактивации вирусов, репродуцированных в культуре клеток, с помощью этиленмина, используя процедуры, описанные для производства вакцины. Выбранное конечное разведение представляет разведение, которое после добавления равного объема разбавителя дает абсорбцию в верхней части линейной области титрационной кривой (оптическая плотность приблизительно 1,5). В качестве растворителя используется ЗФР, содержащий 0,05% Твин 20, 10% нормальную бычью сыворотку и 5% нормальную кроличью сыворотку и феноловый красный индикатор (блокирующий буфер).

Антисыворотка морской свинки, полученная посредством прививки морских свинок 146S антигеном вируса ящура одного из семи серотипов и предварительно блокированная нормальной бычьей сывороткой, используется в качестве детекторных антител. Заранее определенные оптимальные концентрации готовят в блокирующем буфере, ЗФР, содержащем 0,05% Твин 20 и 5% сухое, обезжиренное молоко (PBSTM).

Кроличий (или овечий) иммуноглобулин против глобулинов морской свинки, конъюгированный с пероксидазой хрена и предварительно блокированный нормальной бычьей сывороткой, используется в качестве конъюгата в заранее определенной оптимальной концентрации в PBSTM блокирующем буфере.

Готовят разведения тестируемых сывороток крови с помощью PBST блокирующего буфера.

Твердофазный конкурентный ИФА имеет более высокую специфичность, но его чувствительность такая же, как у жидкофазного блокирующего ИФА (Maskay *et al.*, 2001; Raiba *et al.*, 2004). Были описаны методы для получения вторичных и рабочих стандартных сывороток (Goris & De Clerq, 2005a), а также для оценки рабочих характеристик анализа методом составления графиков (Goris & De Clerq, 2005b).

### **2.2.1. Методика анализа**

- i) ИФА планшеты сенсibiliзируют кроличьей антисывороткой, гомологичной используемому антигену, разведенной в карбонатном/биокарбонатном буфере, pH 9,6, по 50 мкл/лунку, и оставляют на ночь во влажной камере при температуре 4°C.
- ii) ИФА планшеты промывают три раза ЗФР.
- iii) Затем в каждую лунку ИФА планшетов добавляют 50 мкл антигена вируса ящура, разведенного в блокирующем буфере. (Блокирующий буфер: 0.05% [вес/объем] Твин 20, 10% [объем/объем] нормальная бычья сыворотка, 5%

[объем/объем] нормальная кроличья сыворотка). Планшеты накрывают и помещают в орбитальный шейкер при 37°C на один час, при постоянном встряхивании.

- iv) После трехразового промывания планшетов с помощью ЗФР, в каждую лунку добавляют 40 мкл блокирующего буфера, а затем 10 мкл тестируемой сыворотки (или контрольной сыворотки), получая исходное разведение сыворотки 1/5.
- v) Сразу после этого добавляют 50 мкл противоящурной антисыворотки морской свинки, разведенной в блокирующем буфере, получая конечное разведение сыворотки 1/10.
- vi) Планшеты накрывают и инкубируют в орбитальном шейкере при 37°C в течение часа.
- vii) После трехразового промывания с помощью ЗФР, добавляют 50 мкл конъюгата иммуноглобулина против глобулинов морской свинки (предварительно блокированного посредством инкубации в течение часа при комнатной температуре с равным объемом нормальной бычьей сыворотки), разведенного в блокирующем буфере. Планшеты накрывают и инкубируют в течение часа при 37°C на орбитальном шейкере.
- viii) После трехразового промывания планшетов с помощью ЗФР, в каждую лунку добавляют 50 мкл раствора субстрата, содержащего 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> плюс ортофенилендиамин или подходящий альтернативный хромоген.
- ix) Реакцию останавливают через 10 минут путем добавления 50 мкл 1M серной кислоты. Планшеты считывают при длине волны 492 нм на спектрофотометре, подсоединенном к компьютеру.
- x) *Контроли:* На каждом планшете две лунки используют для контроля конъюгата (без сыворотки морской свинки), четыре лунки для сильно- и слабо-положительных сывороток, две лунки для отрицательных сывороток, и четыре лунки для 0% конкуренции (без тестируемой сыворотки).
- xi) *Интерпретация результатов:* Для каждой лунки вычисляют процент ингибирования, либо вручную, либо используя подходящую компьютерную программу ( $100 - [\text{оптическая плотность каждой тестовой или контрольной величины} / \text{средняя оптическая плотность } 0\% \text{ конкуренции}] \times 100\%$ ), показывающий степень конкуренции между тестируемой сывороткой и противоящурной антисывороткой морской свинки за антигены вируса ящура на ИФА планшете. Лаборатории должны провести валидацию данного анализа в отношении значения точки разделения, выше которого сыворотки считаются положительными, учитывая следующее: 1) конкретные исследуемые серотипы и штаммы вируса, 2) цель тестирования, 3) тестируемая популяция, используя методы, описанные в Главе 1.1.6. *Принципы и методы валидации диагностических анализов для инфекционных болезней.* В Референтной лаборатории МЭБ в Пирбрайте, для серотипа О, для всех видов животных, в целях демонстрации свободы от инфекции у интактного поголовья, степень ингибирования выше 60%

считается положительным результатом (Paiba *et al.*, 2004). Для обеспечения максимальной чувствительности, например, когда происходит сертификация отдельных животных для международной торговли, диапазон неубедительных результатов может быть установлен между 40 и 60%.

### 2.3. Жидкофазный блокирующий иммуноферментный анализ

Антигены получают из отобранных штаммов вируса ящура, выращенных на монослоях клеток ВНК-21. Используют неочищенные супернатанты, которые предварительно титруют в серии двукратных разведений, но без сыворотки. Выбранное конечное разведение - это разведение, которое после добавления равного объема разбавителя (см. ниже) дает абсорбцию в верхней части линейного области титрационной кривой (оптическая плотность приблизительно 1,5). В качестве разбавителя используют ЗФР, содержащий 0.05% Твин 20, и феноловый красный индикатор (PBST). Другие реагенты, используемые в тесте, такие же что и в твердофазном конкурентном ИФА. Ниже описана примерная процедура теста. Температура и время инкубации могут варьировать в зависимости от протокола исследования.

#### 2.3.1. Процедура теста

- i) ИФА планшеты сенсibiliзируют кроличьей антисывороткой, гомологичной используемому антигену, в объеме 50 мкл/лунка, и оставляют на ночь во влажной камере при комнатной температуре.
- ii) ИФА планшеты промывают три раза с помощью ЗФР.
- iii) На многолуночных планшетах с U-образным дном (планшеты носители) готовят двукратные серии каждой тестируемой сыворотки крови в двух повторностях в объеме 50 мкл, начиная с 1/8. В каждую лунку добавляют 50 мкл постоянной дозы вирусного антигена, который гомологичен кроличьей антисыворотке, используемой для сенсibiliзирования планшетов, и данные смеси оставляют на ночь при 4°C или инкубируют при 37°C в течение часа. Добавление антигена увеличивает конечное разведение сыворотки до 1/16.
- iv) Затем 50 мкл смесей сыворотка/антиген переносят с планшетов-носителей на ИФА планшеты, сенсibiliзированные кроличьей сывороткой. Данные планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение часа в ротационном шейкере.
- v) После промывания в каждую лунку добавляют 50 мкл антисыворотки морской свинки, гомологичной к вирусному антигену, использованному в предыдущем этапе (iv) (предварительно блокированной нормальной бычьей сывороткой и разведенной PBST, содержащем 5% обезжиренное сухое молоко). Затем планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение часа в ротационном шейкере.
- vi) Планшеты промывают, и в каждую лунку добавляют 50 мкл кроличьего иммуноглобулина против глобулинов морской свинки, конъюгированного с пероксидазой хрена (предварительно блокированного нормальной бычьей сывороткой и разведенного PBST, содержащем 5% обезжиренное сухое

молоко). Планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение часа в ротационном шейкере.

- vii) Планшеты снова промывают три раза, и в каждую лунку добавляют 50 мкл раствора субстрата, содержащего 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и ортофенилендиамин или подходящий альтернативный хромоген.
- viii) Реакцию останавливают через 15 минут путем добавления 50 мкл 1M серной кислоты. Планшеты считывают при длине волны 492 нм на спектрофотометре, подсоединенном к компьютеру.
- ix) Контроли: На каждой планшете должно быть, как минимум, по 4 лунки с сильно положительной, слабо положительной и отрицательной бычьей эталонной сывороткой в конечном разведении 1/32 вместе с эквивалентным количеством лунок контроля реакции (антигена), содержащих только антиген в разбавителе, без сыворотки. При проведении тестов посредством титрования в конечной точке, как минимум на одной планшете каждого цикла исследования должны присутствовать серии двукратных разведений в двух повторностях положительной и отрицательной гомологичной бычьей эталонной сыворотки.
- x) *Интерпретация результатов*: Титры антител выражают в виде 50% титра в конечной точке, т.е. разведения, при котором реакция тестируемой сыворотки дает оптическую плотность равную 50% ингибиции срединной оптической плотности лунок контроля реакции (антигена) (Kärber, 1931). Срединное значение вычисляют в виде среднего значения двух средних значений лунок с контролем реакции, исключая из вычислений самые высокие и самые низкие значения (альтернативно, можно использовать среднее значение после установления подходящих предельно допустимых показателей в целях контроля вариации между лунками). В целом, сыворотки с титрами равными 1/90 или выше считаются положительными. Титры ниже, чем 1/40, считаются отрицательными. Для сертификации отдельных животных в целях международной торговли, титры выше 1/40, но ниже 1/90 считаются сомнительными, и возможно потребуется отбор дополнительных образцов сыворотки для тестирования; результаты считаются положительными, если второй образец имеет титр 1/40 или выше. Для серологического надзора на уровне стада, как части статистически достоверного серологического обследования, возможно соответствующим значением точки разделения будет 1/90. Титры точки разделения для оценивания иммунологической защиты, предоставляемой вакцинацией, следует устанавливать исходя из опыта по получению результатов теста на иммуногенность при использовании релевантной вакцины и целевых видов животных.

#### **2.4. Тест для обнаружения антител к неструктурным белкам**

Антитела к экспрессированным рекомбинантным неструктурным белкам вируса ящура (например, 3A, 3B, 2B, 2C, 3ABC), можно измерить при помощи ИФА различных форматов или иммуноблотинга. В этих ИФА используются либо очищенные антигены, абсорбированные непосредственно на микропланшеты, либо используются поликлональные или моноклональные антитела для захвата специфических антигенов из полуочищенных препаратов (Bergman *et al.*, 2000; De

Diego *et al.*, 1997; Mackay *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 1998). Метод скрининга показателей, используемый в Panaftosa, подробно описан ниже. Было выявлено, что другие виды непрямого и конкурентного ИФА, обнаруживающие антитела КРС к ЗАВС, обладают равнозначной диагностической эффективностью (Broschi *et al.*, 2006). Результаты этого же исследования подтверждают предварительные данные, полученные Panaftosa, которые позволяют предположить, что диагностическая эффективность этих тестов сходна при их применении для КРС, овец и свиней.

#### **2.4.1. Непрямой иммуноферментный анализ**

##### **а) Подготовка рекомбинантных антигенов**

См. Раздел В.2.4.2. *Иммуноферментный элеткроблоттинг*

##### **б) Процедура теста**

- i) Микропланшеты сенсибилизируют с помощью 1 мкг/мл слитого антигена ЗАВС в карбонатном/бикарбонатном буфере, рН 9,6 (по 100 мкл в лунку) в течение ночи при 4°C. Антиген ЗАВС экспрессирован и очищен, как указано для тестов методом иммуноферментного электроблоттинга (Neizert *et al.*, 1991).
- ii) Планшеты промывают шесть раз с помощью ЗФР, рН 7,2, дополненным 0,05% Твин 20 (PBST).
- iii) Тестируемые сыворотки (по 100 мкл в лунке) добавляют в разведении 1/20 в блокирующем буфере, состоящем из ЗФР, 0,05% Твина 20, 5% обезжиренного сухого молока, 10% лошадиной сыворотки и 0,1% лизата *Escherichia coli*. Каждый планшет содержит набор сильно и слабо положительных и отрицательных контролей, калиброванных по международным стандартным сывороткам, описанным ниже.
- iv) Планшеты инкубируют в течение 30 минут при 37°C и промывают шесть раз с помощью PBST.
- v) Производят оптимальное разведение конъюгированного с пероксидазой хрена кроличьего антивидавого IgG в блокирующем буфере, затем добавляют по 100 мкл в лунку, и планшеты инкубируют в течение 30 минут при 37°C.
- vi) После шестиразового промывания, каждую лунку заполняют 100 мкл 3'3', 5'5'- тетраметилбензидином плюс 0,004% (вес/объем) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в фосфатном/цитратном буфере, рН 5,5.
- vii) Реакцию останавливают после 15 минутной инкубации при комнатной температуре, добавляя 100 мкл 0,5М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Показатели поглощения считывают при длине волны 450 нм и 620 нм для поправки на фон.
- viii) *Интерпретация результатов:* Результаты тестов выражают в виде процента положительности по отношению к сильно положительному контролю [(оптическая плотность тестовых или контрольных

лунок/оптическая плотность сильно положительного контроля)  $\times 100$ ] или, альтернативно, в виде тест/контроль индекса относительно контроля точки разделения (например, положительная пороговая величина). Анализ спектра антител к NSP по уровням реактивности в стадах, наряду со стратификацией возраст/вакцинация, способствует интерпретации статуса стада по инфекции в вакцинированных популяциях (Bergmann *et al.*, 2003). Необходимо определить значения точек разделения в тестах вместе с зон сомнительных значений или без них с учетом цели тестирования и предполагаемой целевой популяции. Образцы, показавшие не позволяющие сделать окончательный вывод результаты, можно протестировать повторно с помощью подтверждающих тестов, иммуноферментного электроблоттинга или ИФА с вторичными неструктурными белками (принимая во внимание условную зависимость между двумя тестами). При разработке программы серологического надзора следует учитывать чувствительность и специфичность всей тест-системы. Хотя NSP ИФА и не является подходящим тестом для сертификации животных перед их перемещением, он может быть важным вспомогательным средством в обстоятельствах, когда серотип или подтип вируса в стране происхождения неизвестны.

#### **2.4.2. Иммуноферментный электроблоттинг (ЕИТВ)**

Иммуноферментный электроблоттинг (ЕИТВ) широко применяется в Южной Америке, в качестве подтверждающего теста для вышеописанного метода скрининга. Дополнительную информацию можно получить в Референтной лаборатории МЭБ, Panafinsa, Панамериканская организация здравоохранения/Всемирная организация здравоохранения (РАНО/WHO).

##### **а) Подготовка тестовых полосок, содержащих рекомбинантные антигены**

- i) Пять полученных с помощью методов биоинженерии неструктурных белков вируса ящура, 3А, 3В, 2С, 3D и 3АВС экспрессируют в *E. coli* С600 посредством термоиндукции. Полипептид 3D экспрессируют в его полной форме (McCullough *et al.*, 1992), тогда как остальные белки получают в виде слияний с N-терминальной частью гена полимеразы MS-2 (Strebel *et al.*, 1986).
- ii) Экспрессированную полимеразу очищают на фосфоцеллюлозе, а затем используют колонки поли (U)-Сефарозы. Слитые белки 3А, 3В, 2С и 3АВС очищают посредством последовательного экстрагирования бактериальных экстрактов с увеличением концентрации мочевины. Фракцию 7М, содержащую слитые белки, подвергают дополнительной очистке посредством препаративного 10% SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). Полосу слитых белков вырезают из геля и подвергают электроэлюированию (McCullough *et al.*, 1992).
- iii) Смесь, содержащую 20 нг/мл каждого одного из очищенных рекомбинантных полипептидов, сепарируют на 12,5% SDS-PAGE и электрофоретически перемещают на нитроцеллюлозу (McCullough *et al.*, 1992).

##### **б) Процедура теста**

- i) Следует определить необходимое число тестовых полосок, принимая во внимание, что для каждой нитроцеллюлозной пластины, определяющей один перемещенный гель, необходимо провести анализ положительной, слабоположительной, пороговой и отрицательной контрольной сыворотки. В целом, из геля должно получиться 24 нитроцеллюлозных полоски, каждая шириной 3 мм.
- ii) В каждую лунку добавляют 0,8 мл насыщающего буфера (50 мМ Tris/HCl, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 0,2% Твин 20, 5% обезжиренное сухое молоко; и 0.05% бактериальный лизат E.coli). Сенсибилизированные антигеном полоски блокируют посредством размещения лотков на шюттль-аппарат и встряхивают в течение 30 минут при комнатной температуре (20-22°C).
- iii) Разведение в 1/200 тестируемых сывороток и каждого из контролей добавляют в подходящий лоток. Полоски должны быть полностью погружены и расположены лицом вверх, и должны находиться в таком положении в течение всего процесса.
- iv) Полоски инкубируют в течение 60 минут на шюттль-аппарате при комнатной температуре.
- v) Жидкость удаляют из лотков, и каждую тестовую полоску промывают три раза промывочным раствором (50 мМ Tris/HCl, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 0,2% Твин 20), путем взбалтывания в течение 5 минут.
- vi) В каждую лунку добавляют конъюгированный с щелочной фосфатазой кроличий анти-бычий раствор, после чего полоски инкубируют посредством встряхивания в течение 60 минут при комнатной температуре.
- vii) Жидкость удаляют из лотков, и каждую тестовую полоску промывают три раза промывочным раствором, описанном выше.
- viii) Раствор субстрата (0,015% бромохлориндолилфосфат/0.03% нитросиний тетразолий) готовят в субстратном буфера (100 мМ NaCl; 5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 100 мМ Tris/HCl, pH 9,3) и добавляют в каждую тестовую лунку.
- ix) Полоски инкубируют, поместив тестовый лоток на орбитальный миксер и встряхивая до тех пор, пока контроль точки разделения не покажет 5 отчетливо видимых полос. Полоски промывают проточной деионизированной водой и высушивают на воздухе.
- x) *Интерпретация результатов:* Результаты иммуноферментного электроблоттинга (ЕИТВ) можно сканировать с помощью денситометра, хотя визуальный метод, несмотря на его большую субъективность, также считается подходящим. Производят тестирование отдельных контрольных сывороток, которые демонстрируют минимальное, но стойкое окрашивание для каждого из пяти антигенов. Тестируемый образец считается положительным, если антигены 3ABC, 3A, 3B и 3D ( $\pm 2C$ ) демонстрируют плотность окрашивания равную или выше, чем таковая у их соответствующих контролей. Образец считается отрицательным, если два или более антигенов демонстрируют плотность ниже, чем у их контрольных

сывороток. Тестируемые образцы, не соответствующие ни одному из профилей, считаются сомнительными.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Контроль ящура лежит в сфере национальной и региональной ответственности, вследствие чего во многих странах вакцины могут быть использованы только под контролем ветеринарных органов.

Указания по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Указания, представленные здесь и в Главе 1.1.8, намеренно являются общими по своей природе и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями. В отдельных странах и регионах применяются различные требования, касающиеся качества, безопасности и эффективности, для получения производителем разрешения или лицензии на производство ветеринарной вакцины. По возможности, производители должны стремиться получать такое разрешение или лицензию на свои противоящурные вакцины, в качестве независимого подтверждения качества производимого ими продукта.

Объекты по производству противоящурной вакцины должны осуществлять свою деятельность при наличии соответствующих процедур биобезопасности и защиты, как указано в Главе 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарты по управлению биологическим риском в ветеринарной лаборатории и виварии*.

Рутинная вакцинация против вируса ящура проводится во многих странах или зонах, признанных свободными от ящура с вакцинацией, и в странах, где данная болезнь является эндемичной. Напротив, в ряде стран, свободных от болезни, никогда не проводилась вакцинация своих сельскохозяйственных животных, а предпочтение отдавалось использованию строгого контроля перемещения животных и выбраковке инфицированных и контактирующих с ними животных в случае вспышек. Несмотря на это, многие страны, свободные от болезни, не отказываются от опции проведения вакцинации и имеют свои собственные стратегические запасы высококонцентрированных инактивированных вирусных препаратов. Такие запасы антигена обеспечивают возможность поставки полученных вакцин в чрезвычайной ситуации и в короткие сроки (См. также Главу 1.1.10 *Банки вакцин*).

Традиционные вакцины против вируса ящура могут быть охарактеризованы, как имеющие фиксированный состав, включающий определенное количество (предельно допустимое количество) одного или более химически инактивированных полученных посредством клеточного культивирования препаратов посевного вируса, смешанных с подходящим адъювантом/ми и вспомогательными веществами. См. Главу 1.1.8 относительно вакцин, произведенных на основе биотехнологий, таких как рекомбинантные или пептидные вакцины.

Банки антигенов можно охарактеризовать, как запасы антигенных компонентов, зарегистрированных или лицензированных соответственно конечной вакцине, и которые можно хранить при ультранизких температурах в течение продолжительного периода времени для последующего составления вакцин, как и когда потребуется.

Составление вакцин производят для конкретной цели, и в случае, когда вакцины предназначены для использования у КРС, можно использовать вакцины на основе таких адъювантов, как гидроокись алюминия, сапонин и масляный адъювант. Для использования у свиней предпочтительны двойные масляные эмульсии по причине их эффективности.

Противоящурные вакцины можно классифицировать на вакцины со «стандартной» и «более высокой» иммуногенностью. Составление вакцин со стандартной иммуногенностью производят таким образом, чтобы они содержали достаточное количество антигена и соответствующий адъювант, для гарантирования их соответствия минимально требуемому уровню иммуногенности (рекомендованные  $3PD_{50}$  [50% протективная доза]; 75% ЕРР (ожидаемый процент защиты) или 12 защищенных животных из 16 вакцинированных и подвергнутых контрольному заражению в РGP тесте [тест для определения степени защиты от генерализованной инфекции нижних конечностей]) в течение срока годности, заявленного производителем. Этот тип вакцины обычно подходит для кампании рутинной вакцинации. Для вакцинации интактных популяций с целью контроля вспышек ящура, рекомендуются использовать вакцины с более высокой степенью иммуногенностью (например,  $>6 PD_{50}$  в течение срока годности, заявленного производителем) ввиду их более широкого спектра предоставляемого иммунитета, а также быстрого наступления защиты.

По причине наличия множества серотипов вируса, общепринятой практикой является изготовление вакцин из двух или более различных серотипов вируса. В отдельных районах, возможно целесообразно, включать больше одного штамма вируса на серотип для обеспечения широкого антигенного охвата против превалирующих вирусов.

## **1. Контроль посевного вируса**

### **1.1. Характеристики посевного вируса**

Отбор исходных посевных вирусов в идеале следует производить на основании простоты их роста в клеточной культуре, урожая вируса, антигенной стабильности на производственном уровне и широкого антигенного спектра. Изоляты для получения исходных посевных вирусов (MSVs) должны быть охарактеризованы и распространяться предпочтительно Референтными лабораториями МЭБ по ящуру; их следует выбирать в соответствии с эпизоотологической важностью каждого штамма.

Конкретный источник изолята должен быть зарегистрирован и включать такую информацию как местоположение, вид животного и тип материала, из которого был получен вирус. Для идентификации штамма вируса ящура необходимо использовать уникальную номенклатуру. В соответствии с Главой 1.1.8 следует зарегистрировать историю пассирования вируса *in-vitro* и подробную информацию относительно его составляющих. Уровень пассирования посевного вируса должен быть минимальным во избежание антигенных и генетических изменений.

### **1.2. Метод культивирования**

Методы культивирования должны соответствовать положениям главы 1.1.8. Если нет подходящего стабильного штамма вируса, новые вакцинные штаммы получают посредством создания исходных посевных вирусов из местных полевых

изолятов, адаптируя их к росту в суспензии или в монослойных клетках посредством серийных пассажей. Для того чтобы устранить риск контаминации вирусов с липидной оболочкой, рекомендуется подвергать предполагаемые исходные посевные вирусы валидированной обработке органическим растворителем до или во время адаптации.

### **1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма**

Исходные посевные вирусы (MSVs) должны быть хорошо охарактеризованы антигенно и генетически и признаны чистыми и свободными от всех посторонних веществ в соответствии с Главой 1.1.9 *Тесты на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования* и внесены в список соответствующими лицензирующими органами власти. Должна быть установлена гомология с исходными кандидатными изолятами и доказана эффективность против циркулирующих штаммов, на основе которых они были разработаны. Зачастую это включает в себя использование ряда методов, при этом наиболее достоверными являются анализы степени защиты *in-vivo*. Альтернативно, также можно использовать тесты *in-vitro* (предпочтительно реакцию нейтрализации вируса), для проведения которых необходимо наличие пост-вакцинальных сывороток крови против этих исходных посевных вирусов (см. раздел D этой Главы).

Посевные вирусы могут храниться при низкой температуре (например, -70°C) или в лиофилизированном состоянии. Рабочие посевные вирусы могут быть размножены с помощью одного или нескольких пассажей исходного посевного вируса и использованы для инфицирования конечной клеточной культуры.

Следует уделять внимание минимизации риска передачи возбудителей трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ) посредством гарантирования того, что материалы, представляющие риск в отношении ТГЭ, не используются в качестве источника вируса или в любой среде, используемой в размножении вируса.

### **1.4. Процедура временного утверждения нового исходного посевного вируса, используемая в чрезвычайной ситуации, и последующий выпуск составленных вакцин**

В случае заноса в регион нового штамма, защита против которого не обеспечивается существующими вакцинными штаммами, возможно, будет необходимо получить новый вакцинный штамм из репрезентативного полевого изолята. Перед утверждением нового исходного посевного вируса, следует продемонстрировать полное соответствие релевантным руководящим положениям для доказательства свободы от всех посторонних агентов, включенных в списки соответствующих лицензирующих органов власти, используя как общие, так и специфичные тесты, и установления гомологии с оригинальными кандидатными изолятами. Может потребоваться достаточно много времени, чтобы получить специфическую антисыворотку, необходимую для нейтрализации нового штамма, чтобы в дальнейшем использовать ее в общих тестах по обнаружению посторонних агентов, и для проведения других специфических тестов, которые требуют специализированных методов. Поэтому, в чрезвычайных ситуациях, когда недостаточно времени для осуществления полного тестирования исходных посевных вирусов, временное утверждение

нового штамма должно производиться на основании результатов анализа риска возможной контаминации антигена, полученного из нового исходного посевного вируса, посторонними агентами. При такой оценке риска следует учитывать, что инактивация вируса производится химическим инактивантом с кинетикой первого порядка. Дальнейшее подтверждение предусматривается требованием в отношении мониторинга и регистрации кинетики инактивации для каждой производственной партии.

## 2. Метод производства

Рекомендуемый метод размножения вируса для производства антигена представляет собой выращивание вируса ящура в масштабированных суспензионных культурах или монослоях, используя клеточные линии, в стерильных условиях.

Для производства вакцины можно использовать эпителий языка КРС в условиях выживания в среде, содержащей соли, но не содержащей продукты биологического происхождения, но только, если метод производства полностью соответствует стандартным требованиям, изложенным в Главе 1.1.8. Кроме того, для устранения риска контаминации вирусом с липидной оболочкой перед инактивацией с использованием бинарного этиленмина/этиленмина (ВЕI/ЕI) собранная вирусная суспензия должна быть подвергнута валидированной обработке органическим растворителем. В целях обеспечения однородности и безопасности конечного продукта следует проводить адекватные тесты в процессе производства и на конечном продукте. Следует уделять внимание минимизации риска передачи возбудителей трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (например, ГЭ КРС, ТГЭ) посредством гарантирования использования безопасного источника эпителия.

Подходящий штамм вируса используется для инфицирования суспензии или монослоев стабильной клеточной линии, такой как ВНК-21. Следует доказать, что такие клеточные культуры свободны от контаминирующих микроорганизмов.

Когда считается, что вирус достиг максимального роста, культуру освещают, часто посредством центрифугирования и/или фильтрации. Вирус впоследствии инактивируют, добавляя инактивант первого порядка, обычно этиленмин (ЕI) в форме бинарного этиленмина (ВЕI) (Bahnmann, 1990). Важно полностью соблюдать необходимые меры безопасности при работе с ВЕI/ЕI. В суспензию вируса добавляют ВЕI, получая заранее установленную конечную концентрацию. Процедура инактивации должна быть надлежащим образом валидирована и задокументирована в целях демонстрации кинетики инактивации и результатов для контролей инактивации. Время обработки с помощью ВЕI и температура, используемые для инактивации, должны быть валидированы для фактических используемых условий и оборудования. Чтобы снизить вероятность того, что живой вирус не вступит в контакт с инактивантом, например, ЕI/ВЕI, необходимо немедленно переместить содержимое сосуда во второй стерилизованный сосуд, оставив в нем для завершения процесса инактивации согласно валидированной кинетике инактивации и с учетом возможных нормативных требований к дополнительному периоду ожидания.

В ходе инактивации, титр вируса контролируется чувствительным и воспроизводимым методом. После завершения инактивации любые остатки ЕI/ВЕI в собранном вирусе необходимо нейтрализовать, например, посредством добавления раствора натрия тиосульфата до получения конечной концентрации 2%.

Инактивированный вирус может быть концентрирован с помощью ультрафильтрации. Концентрированный инактивированный вирус в дальнейшем может быть очищен с помощью такого метода, как хроматография. Эти концентрированные и очищенные антигены могут быть использованы для составления вакцин; или храниться при низких температурах в течение многих лет, и, при необходимости, из них можно изготовить вакцину, путем разведения в соответствующем буфере и добавления адъювантов (Doel & Pullen, 1990).

Традиционные вакцины против ящура обычно создают на основе масляного адъюванта или воды. Вакцины с масляным адъювантом обычно составляют как эмульсию вода в масле, используя такие минеральные масла. Минеральное масло обычно предварительно перемешивают с эмульгирующим веществом перед добавлением части, или всей водной фазы вакцины, и эмульгируют, используя коллоидную мельницу или с помощью непрерывного механического или поточного ультразвукового эмульгатора. Более сложные двойные эмульсии (вода/масло/вода) могут быть изготовлены с помощью повторного эмульгирования в водной фазе, содержащей небольшое количество детергента, такого как Твин 80. В настоящее время в продаже имеются готовые к использованию масляные адъюванты для различных типов эмульсии.

Водная вакцина может быть изготовлена с помощью адсорбции вируса на геле гидроокиси алюминия, одного из компонентов конечной смеси вакцины. Конечная смесь вакцины может содержать другие компоненты, такие как противоспениватель, гидролизат лактальбульмина, триптозо-фосфатный бульон, аминокислоты, витамины, буферные соли и другие вещества. Могут быть также включены такие адъюванты, как сапонин, а также консерванты.

При использовании новых компонентов, включая адъюванты или консерванты, в любой вакцине важно учитывать, что необходимо оценить их статус по остаткам в продуктах, полученных от продуктивных животных, чтобы убедиться в том, что органы, выдающие лицензии, могут получить адекватные гарантии в отношении безопасности потребителей. Данное требование значительно ограничивает выбор адъювантов и консервантов для использования у продуктивных животных.

### **3. Контроль в процессе производства**

Обычно титры вируса достигают оптимального уровня в период с 18 по 24 часа после инфицирования клеточной культуры, в зависимости от серотипа. Время, выбираемое для сбора культуры, может основываться на ряде анализов; например, гибель клеток. Концентрацию вируса можно определить с помощью теста на инфекционность, градиента плотности сахарозы или CsCl или серологических методов. Предпочтительно использовать более одного метода, поскольку они могут дополнять друг друга.

#### **3.1. Кинетика инактивации**

Во время инактивации вируса, следует отбирать образцы через регулярные интервалы с целью мониторинга скорости и линейности процесса инактивации. Титры вируса в образцах определяют путем инокуляции культур клеток, признанных высоко чувствительными к вирусу ящура, например ВНК. Такие культуры позволяют проводить тестирование статистически значимых образцов в воспроизводимых условиях. Инфекционность  $\log_{10}$  образцов, отобранных через равные интервалы, отображают на графике по отношению ко времени, и процедура инактивации не считается удовлетворительной до тех пор, пока, как минимум,

последняя часть наклонной части линии не будет линейной, а экстраполяция не будет указывать на то, что в конце периода инактивации на  $10^4$  литров жидкого препарата не будет менее одной инфекционной частицы.

### **3.2. Контроль инактивации**

Тест на безвредность - это тест, осуществляемый в процессе производства, который следует проводить для каждой партии антигенов. Клетки, используемые для тестирования на наличие остаточного живого вируса, должны подвергаться тестированию на чувствительность, чтобы продемонстрировать, что они пригодны для репликации вируса. После инактивации образец от каждой партии инаktivированного антигена, представляющий собой, как минимум, 200 доз вакцинного антигена, следует протестировать на свободу от инфекционного вируса посредством инокуляции чувствительных монослойных клеточных культур, предпочтительно того же происхождения, что и таковые, используемые для производства антигенов. Возможно, для этого понадобится произвести концентрирование антигенов, и в каждом случае должно быть продемонстрировано, что концентрированный материал не оказывает негативного влияния на чувствительность анализа и не мешает считыванию результатов анализа. Клеточные пласты обследуют ежедневно в течение 2-3 дней, после чего использованную среду переносят на свежие монослои, а в исходные монослои добавляют свежую среду. Используя этот метод, можно амплифицировать следовые количества живого вируса с помощью процедуры пассирования и обнаружить его на основании наблюдаемого ЦПД. В большинстве случаев проводят три пассажа исходного вирусного препарата. Вариантом данного метода является замораживание-оттаивание старых монослоев для высвобождения внутриклеточного вируса, который можно обнаружить посредством дальнейшего пассирования.

## **4. Исследования партии конечного продукта**

### **4.1. Исследование на безвредность**

Инаktivированный антиген в большом объеме и конечный сформулированный продукт следует подвергнуть исследованию на безвредность с целью демонстрации отсутствия инфекционного вируса. В конечном продукте антиген должен быть удален из адьюванта с помощью надлежащего валидированного метода. Образец, представляющий собой как минимум 200 доз вакцины (включая все формы продукта), должен быть использован для исследования на отсутствие инфекционного вируса посредством инокуляции чувствительных монослоев клеточной культуры. После извлечения антиген может быть сконцентрирован для инокуляции в клеточных монослоях. Процедура исследования описана в Разделе С.3.2 *Контроль инактивации*.

### **4.2. Исследование на стерильность**

Инаktivированный антиген в большом объеме, концентрированный антиген и конечный сформулированный продукт должны пройти тестирование на стерильность. Руководство по методам и культурной среде, которые позволяют обнаружить широкий спектр организмов, описаны в Главе 1.1.9.

### **4.3. Исследование на идентичность**

Инактивированный антиген в большом объеме, концентрированный антиген и конечный сформулированный продукт должны пройти тестирование на идентичность для демонстрации наличия релевантных штаммов. Никакие другие серотипы вируса ящура, зарегистрированные для производственной площадки, не должны присутствовать в вакцине, что должно быть продемонстрировано с помощью соответствующих тестов, таких как серотип-специфичная ОТ-ПЦР.

#### **4.4. Исследование на чистоту**

Чистота подразумевает уровень неструктурных белков ящура в конечном продукте, который не должен индуцировать антитела, которые препятствуют проведению серологических исследований, используемых для серологического надзора циркуляции вируса в вакцинированных популяциях. Продукты, заявленные как очищенные от неструктурных белков, должны продемонстрировать уровень очистки. В конечном продукте должно быть продемонстрировано отсутствие реактивности (см. Раздел С.5 *Требования к регистрации вакцины*). В случаях, когда стабильность параметров очистки демонстрируется и утверждается в регистрационном досье, и процесс производства также утвержден в отношении стабильности параметров согласно стандартным требованиям, упоминающимся в Главе 1.1.8, Ветеринарные органы могут дать согласие не проводить это исследование для конечного продукта.

Чистоту вакцины можно подтвердить путем тестирования сыворотки, полученной от животных, вакцинированных, по крайней мере, дважды препаратами из одной серии, на отсутствие антител к неструктурным белкам.

#### **4.5. Исследование на безопасность**

Безопасность конечного продукта следует демонстрировать от партии к партии. Исследование на безопасность проводится для выявления любых нетипичных местных или системных негативных реакций. В случаях, когда стабильность параметров безопасности демонстрируется и утверждается в регистрационном досье, и процесс производства также утвержден в отношении стабильности параметров согласно стандартным требованиям, указанным в Главе 1.1.8, Ветеринарные органы могут дать согласие не проводить это исследование для конечного продукта.

Безопасность можно проверить на животных, используемых для испытания на иммуногенность. Животных инокулируют рекомендованным способом рекомендованной дозой вакцины. Если иммуногенность оценивают с помощью РРР или ЕРР, за животными наблюдают в отношении проявления местных и системных реакций на вакцинацию в течение 30 дней проведения испытания на иммуногенность. Если используется тест на  $PD_{50\%}$ , то, как минимум два здоровых сероотрицательных целевых животных инокулируют, как описано выше, и наблюдают на наличие местных и системных реакций на вакцинацию в течение не менее 14 дней. Любую нежелательную реакцию, возникшую по причине использования вакцины, необходимо оценить, и это может препятствовать приемке партии.

#### **4.6. Испытание на иммуногенность**

Иммуногенность проверяют на конечном сформулированном продукте, или в качестве альтернативы для банков антигенов, на репрезентативной партии вакцины, приготовленной из того же инактивированного антигена.

Контрольное заражение с целью проверки вакцины является стандартом тестирования на иммуногенность. Однако могут также использоваться непрямые тесты в целях практичности и с учетом аспектов благополучия животных, если была валидирована корреляция в отношении ожидаемой длительности защиты у целевых животных. Зачастую непрямые тесты для оценки иммуногенности охватывают титрацию антител после вакцинации целевых видов. Также могут использоваться и другие методы, валидированные соответствующим образом.

В идеале непрямые тесты осуществляют для каждого штамма в отношении одного вида животных и для каждого состава вакцины, с целью установления корреляции между результатами непрямых тестов и эффективностью вакцины.

#### **4.6.1. Ожидаемый процент защиты (EPP) (Maradei *et al.*, 2008; Periolo *et al.*, 1993)**

Ожидаемый процент защиты устанавливает вероятность того, что после единичного вакцинирования КРС будет защищен от контрольного заражения 10 000 инфицирующими дозами для КРС.

- i. Требуется индивидуальные сыворотки от группы из 16 или 30 18-24 месячных КРС, собранные через 30-60 дней после вакцинации, проведенной с использованием полной дозы вакцины.
- ii. Эту панель сывороток и сыворотки от двух контрольных особей КРС тестируют на титры антител к гомологичному штамму противоящурной вакцины с помощью жидкофазного блокирующего ИФА или РВН (см. Раздел В.2.1 *Нейтрализация вируса* и В.2.3 *Жидкофазный блокирующий иммуноферментный анализ*).
- iii. Антигены, используемые в ИФА, могут быть инактивированы, используя ВЕI.
- iv. Ожидаемый процент защиты определяют с помощью заранее заданных таблиц корреляции между серологическими титрами и клинической защитой<sup>1</sup> (Maradei *et al.*, 2008; Periolo *et al.*, 1993).
- v. Партии, где ожидаемый процент защиты составляет как минимум 75% (если вакцинировано 16 голов КРС) или как минимум 70% ожидаемого процента защиты (если вакцинировано 30 голов КРС), считаются удовлетворительными в отношении иммуногенности.

Наличие более одного серотипа в вакцине не снижает уровень индуцирования антител к другому серотипу или корреляцию титра антител с защитой.

#### **4.6.2 Другие методы оценки защиты**

Были опубликованы другие тесты с использованием различных методов ИФА и методов реакции нейтрализации вируса, позволяющие косвенно оценить

---

<sup>1</sup> Референтная лаборатория МЭБ в Бразилии может предоставить таблицы по запросу

защиту, которую дает вакцина. Их результаты могут приниматься только в случае наличия сильной корреляции с защитой в отношении тестируемого штамма вакцины и при использовании серологического метода, что было научно продемонстрировано.

## **5. Требования к регистрации вакцины**

### **5.1. Процесс производства**

Для регистрации вакцины вся информация, касающаяся производства вакцины и контроля качества (см. Разделы С.1-4), должна быть представлена на рассмотрение государственного уполномоченного органа. Эта информация должна быть предоставлена в отношении трех последующих серий вакцины в объеме не менее чем 1/3 от минимального разрешенного объема промышленной серии из страны происхождения.

### **5.2. Безопасность**

В целях получения разрешения контролирующих органов тройная партия вакцины должна быть протестирована на предмет локальной и системной токсичности по каждому рекомендованному способу введения вакцины в *in-vivo* тесте по крайней мере у восьми животных каждого целевого вида. Рекомендуется вводить двойную дозу (т.е. 2 инъекции) и повторно однократную дозу (через 14 дней) вакцин, содержащих максимально разрешенное количество антигенов. Всего животные получают три инъекции. Животных наблюдают на наличие локальных и системных реакций на вакцину не менее 14 дней после каждой инъекции. Каждую нежелательную реакцию, связанную с применением вакцины, необходимо оценить. По данной причине вакцина может быть не принята государственным ветеринарным уполномоченным органом.

### **5.3. Эффективность**

Эффективность вакцины оценивают непосредственно у вакцинированных животных, определяя их сопротивляемость живым вирусам при контрольном заражении, или непрямым способом в условиях *in vitro*, используя общепринятые корреляции. Неточность измерений в тесте должна учитываться при интерпретации их значимости (Goris *et al.*, 2008). Эффективность вакцины необходимо оценивать по отношению к каждому штамму, который разрешен для использования в вакцине.

Живые референтные вирусы ящура, соответствующие основным вирусным штаммам вакцины, используемым в регионе, доступны при определенных условиях в Референтных лабораториях МЭБ по ящуру в регионе, а также в национальных ветеринарных органах в стране. Такие референтные вирусы хранят при ультранизких температурах и отправляют в строгом соответствии с правилами перевозки.

Запас вируса для аликвотирования получают из поражений, по крайней мере, двух животных КРС возрастом старше 6 месяцев, которые были признаны свободными от антител вируса. Животным вводят транквилизатор, затем примерно в 20 участков языка внутрикожно вводят суспензию по 0,1 мл на каждый участок. Везикулярную ткань языка или других органов и везикулярную жидкость собирают в пик появления поражений, приблизительно через 2 дня.

Собранную ткань мацерируют и готовят 2 % суспензию, которую фильтруют через 0,2 мкл фильтр, аликвотируют и быстро замораживают в газообразной фазе жидкого азота; это образует запас контрольного вируса. Инфекционные титры данного запаса определяют как в культуре клеток (TCID<sub>50</sub>), так и у двух особей КРС (VID<sub>50</sub>). Двум КРС, которым предварительно ввели транквилизатор, делают внутрикожную инъекцию в язык десятикратными разведениями (1/10 через 1/10,000), одним разведением в 4 места. Титрации КРС считают спустя 2 дня. Обычно титры оказываются больше 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> на 0,1 мл и больше 10<sup>5</sup> VID<sub>50</sub> на 0,1 мл, их вычисляют, используя метод Спирмана-Карбера. Разведение для использования в контрольном заражении КРС составляет 10 000 VID<sub>50</sub>, объемом 2 x 0,1 мл внутриязычной инъекции для тестов PD<sub>50</sub> и PGP.

### 5.3.1. PD<sub>50</sub> тест

Количество защитных доз в вакцине определяется по степени резистентности к живым вирусам контрольного заражения группы животных, получающих вакцину в разных объемах. Необходимо использовать КРС по крайней мере шестимесячного возраста, полученный из областей, свободных от вируса ящура, которые не были ранее вакцинированы против ящура и свободны от антител к вирусу ящура. Три группы, состоящие из не менее 5 особей КРС в каждой, должны быть вакцинированы рекомендованным производителем способом. Вакцинирование в каждой группе следует осуществлять в различных дозах, вводя различный объем вакцины. Например, если на этикетке написано, что 2 мл инъекции соответствует введению 1 дозы вакцины, ¼ дозы вакцины будет получена путем введения 0.5 мл и 1/10 дозы будет получена путем введения 0.2 мл. Этим и контрольным животным (двух невакцинированных животных) подвергают контрольному заражению суспензией бычьего вируса через 3 недели (водной) или через 4 недели (масляной) после вакцинации, которая крайне вирулентна и подходит типам вируса в исследуемой вакцине, инокулируя эквивалент объема в 10 000 VID<sub>50</sub> (50% инфекционная доза КРС) внутрикожно в двух местах на верхней поверхности языка (0.1 мл на место). Животные наблюдаются в течение 8 дней. У незащищенных животных поражения появляются на других участках, помимо языка. У контрольных животных поражения должны быть, по крайней мере, на трех конечностях. У защищенных животных в каждой группе высчитывается содержание PD<sub>50</sub> в вакцине. Существует множество различных методов высчитывания PD<sub>50</sub>, но метод, основанный на методе Спирмана-Карбера (1931), обычно предпочтителен при интерпретации оценок PD<sub>50</sub>, высчитанных подобным способом. Вакцина должна содержать, по крайней мере, 3 PD<sub>50</sub> в одной дозе для КРС).

### 5.3.2. PGP тест (защита от генерализованной инфекции нижних конечностей)

Для этого метода, группа из 16 серонегативных к вирусу ящура особей КРС в возрасте 18-24 месяцев, с одинаковыми характеристиками, описанными для теста на установление PD<sub>50</sub>, вакцинируются дозой КРС способом и объемом, рекомендованным производителем. Через 4 недели после вакцинации или позднее этих животных и группу контрольных животных, состоящих из двух невакцинированных животных, подвергают контрольному заражению суспензией бычьего вируса, которая крайне вирулентна и подходит типам

вируса в тестируемой вакцине, путем инокуляции объема, равного 10 000  $BD_{50}$  (50% инфекционной дозы КРС), внутривенно в два участка на верхней поверхности языка (0,1 мл на один участок). Животных наблюдают 7-8 дней. У незащищенных животных поражения появляются на конечностях через 7 дней после инокуляции. У контрольных животных поражения должны быть, по крайней мере, на трех конечностях. При обычном профилактическом использовании вакцина должна защищать, по крайней мере, 12 животных из 16 вакцинированных. Этот тест не дает оценку того, как много защитных доз содержится в однократной дозе вакцины, но сравнение результатов двух тестов показывает, что 12 защищенных из 16 вакцинированных и зараженных животных коррелирует с показателем 3  $PD_{50}$  (Vianna Filho *et al.*, 1993).

### 5.3.3. Эффективность, установленная при помощи непрямых тестов

Когда для определения эффективности невозможно использовать прямое контрольное заражение, Государственный ветеринарный уполномоченный орган может принять решение об использовании непрямых тестов (таких как нейтрализация вируса или LPB-ELISA), при условии, что существует корреляция между уровнем антител и защитой при контрольном заражении при 10 000  $BD_{50}$ .

### 5.3.4. Эффективность в отношении других видов

Тесты на эффективность в отношении других целевых видов животных, таких как овцы, козы, свиньи или буйволы, или отличаются, или еще не стандартизированы. Как правило, успешные результаты тестирования вакцины на КРС являются показателем качества вакцины и означают, что данная вакцина может быть использована в отношении других, отличных от КРС, видов. В случаях, когда вакцина производится для использования в первую очередь в отношении отличных от КРС видов, может потребоваться проведение теста оценки иммуногенности на этих видах. Что касается овец, коз, Африканских (*Syncerus caffer*) и Азиатских буйволов (*Bubalus bubalis*), в связи с частой бессимптомной природой болезни у этих видов, результаты теста на иммуногенность, проведенного на КРС, могут служить более надежным индикатором качества вакцины, чем тесты на иммуногенность на этих видах, поскольку их результаты зависят от обнаружения клинических признаков.

## 5.4. Чистота: тестирование на антитела к неструктурным белкам

Вирус, циркулирующий внутри популяции, может быть выявлен путем определения антител к неструктурным белкам (NSPs). Кроме того, *Кодекс здоровья наземных животных МЭБ* предписывает тестировать вакцинированных животных на наличие антител к NSPs, что является критерием для получения статуса свободы от вируса ящура после вспышки инфекции, если используется вакцина. Таким же образом, страны, желающие быть признанными свободными от ящура с вакцинацией, должны продемонстрировать отсутствие циркуляции вируса и показать, что вакцинированные животные свободны от антител к неструктурным белкам, появляющимся в результате инфекции. Следовательно, антигены вируса ящура, используемые для создания вакцин, которые могут быть применены в данных обстоятельствах, должны быть очищены с целью снижения количества неструктурных белков. Кроме обеспечения сопроводительной документации по процедурам, задействованным в процесс очищения, производители должны показать

отсутствие иммуногенности к NSPs при прохождении процедуры лицензирования, чтобы предъявить такое требование к товаросопроводительной документации. Если тест на содержание примесей предполагает использование полных вакцинных доз, 8 животных необходимо повторно вакцинировать на 28-30 день после первой вакцинации и провести тест на содержание примесей через 28-30 дней. Допускается не более одного реагирующего на вакцину животного на 28-30 день после ревакцинации. Если реагирует более двух животных на 28-30 день после ревакцинации, партия должна быть отбракована. Если реагирует два животных, производители имеют право провести повторное тестирование данной партии вакцины. Может быть рекомендован метод, при котором вакцинируют не менее 8 неинфицированных голов КРС путем введения полной дозы вакцины, содержащей максимальное количество штаммов и количество антигенов, разрешенных для авторизации. КРС должен быть вакцинирован, по крайней мере, два раза в интервале от 21-30 дней и затем протестирован перед каждой ревакцинацией и через 30-60 дней после последней вакцинации на наличие антител к неструктурным белкам, используя тесты, описанные в разделе В.2.4 *Тесты на выявление антител к неструктурным белкам (NSPs)*. Отрицательные результаты исследований на неструктурные белки подтверждают заявления о том, что вакцина не индуцирует антитела к неструктурным белкам в отношении ряда протестированных инъекций. Можно использовать тех же животных, которых использовали для теста на безопасность, описанного в разделе С.5.2 *Безопасность*.

#### **5.5. Продолжительность иммунитета**

Продолжительность иммунитета, который дает противоящурная вакцина, будет зависеть от ее эффективности (состава и целевой антигенной нагрузки). При прохождении процедуры авторизации производитель должен продемонстрировать продолжительность иммунитета используемой вакцины как при контрольном заражении, так и при использовании утвержденного альтернативного теста, такого как серология в конце требуемого периода защиты, в соответствии с Разделом С.5.3. *Эффективность*. Исследования длительности иммунитета должны проводиться у каждого вида, для которого предназначена вакцина, или производитель должен указать, что продолжительность иммунитета для этих видов неизвестна. Таким же образом, производитель должен продемонстрировать эффективность рекомендованного режима ревакцинации в соответствии с этими нормами, обычно путем определения показателей и кинетики наблюдаемого серологического ответа.

#### **5.6. Стабильность**

Все вакцины, включая вакцины на основе масляной эмульсии, должны тестироваться на предмет стабильности, что является частью исследований на определение срока годности для авторизации.

Срок годности обычной вакцины против вируса ящура обычно составляет 1-2 года, при температуре 2-8°C. Вакцины не должны подвергаться заморозке или храниться при температуре, выше указанной.

Стабильность должна быть протестирована с использованием методов, описанных в разделе 5.3 *Эффективность*, за исключением вакцинирования животных в конце срока годности продукта.

## **5.7. Профилактика (факторы риска)**

Действующие вакцины против вируса ящура нетоксичны и не представляют токсичных рисков для лиц, осуществляющих вакцинацию. Производители должны соответствующим образом предупреждать о том, что в случае самопроизвольного введения препарата необходимо обратиться за медицинской помощью.

## **6. Хранение и мониторинг концентрированных антигенов**

В Главе 1.1.10 предоставлены указания в отношении международных стандартов для банков вакцины.

Процесс хранения концентрированных антигенов при ультранизких температурах для составления в дальнейшем противоящурной вакцины, как описано в Разделе С.2, является традиционной процедурой формирования запасов иммуногенного материала, готового для создания вакцины в случае необходимости. Это позволяет не только создавать стратегический запас антигенов и использовать их в экстренных случаях, но также дает производителям непосредственный доступ к множеству различных штаммов антигена, которые незамедлительно могут быть использованы для приготовления вакцины и отправлены покупателю (Lombard & Fussel, 2007). Подобное создание резервного фонда снижает случаи задержек, связанных с выполнением заказа, особенно, когда требуется мультивалентная вакцина. Другим преимуществом этой процедуры является то, что большая часть исследований на качество может быть выполнено задолго до отправки товара. Необходимо отметить, что концентрированные антигены должны контролироваться в соответствии со стандартами, указанными в Разделах С. 1-4.

### **6.1. Условия хранения**

#### **6.1.1. Помещения**

Важно, чтобы все условия хранения концентрированных антигенов полностью соответствовали принятым международным требованиям, указанным в Главе 1.1.8. Складские помещения, оборудование и процедуры должны обеспечивать безопасность хранения антигенов и защиту от вскрытия, заражения или повреждения.

#### **6.1.2. Предотвращение заражения хранящихся антигенов**

Количество и объем хранящихся доз имеет большое значение, особенно если запас разделен между странами-членами МЭБ, и в случае крайней необходимости каждой стране может потребоваться разное количество доз. Если требуется большой объем вакцины с определенным вакцинным штаммом, которая может быть произведена лишь на нескольких отдельных серийных производствах, менеджерам банка вакцин необходимо либо составить новую серию препарата для дальнейшего тестирования результатов или смешать отдельные серии в подходящий момент для облегчения создания и/или тестирования вакцины.

Важен тип контейнера, используемого для концентрата антигена. В условиях ультранизкой температуры важно использовать контейнеры, изготовленные из материалов, которые не становятся ломкими и хрупкими

при разных температурных режимах и способны выдержать тепловую стерилизацию и хранение в холодильнике.

### **6.1.3. Маркировка хранящихся антигенов**

Концентрированные антигены не нуждаются в маркировке согласно требованиям, предъявляемым к готовой и законченной вакцине, и могут быть маркированы, как «материал, находящийся в процессе обработки». В условиях ультранизкой температуры метод маркирования должен иметь долговременный характер. Исходя из опыта, лучше всего использовать металлическую/пластиковую этикетку, которую прикрепляют к флаконам с помощью проволоки подходящего размера для нанесения информации. Информация должна содержать штамм антигена/вакцины, номер серии, дату получения и также номер индивидуального контейнера или номер исходного раствора. Данная информация должна быть понятна при прочтении и нанесена на бирку несмываемым разметочным карандашом. Необходимо аккуратно вести записи хранения и бережно располагать контейнеры.

### **6.2. Мониторинг хранящихся концентрированных антигенов**

Чрезвычайно важно, чтобы концентрированные антигены хранились в оптимальных условиях и ежедневно контролировались с целью сохранения их эффективности в случае необходимости. Вследствие этого, необходимо проводить мероприятия по постоянному мониторингу этих концентрированных антигенов и, при необходимости, в определенные временные интервалы вводить режим тестирования, чтобы обеспечить целостность антигенного компонента или надлежащую иммуногенность конечного продукта.

Определение количества 146S, серологический ответ после вакцинации или контрольное заражение вакциной используются для мониторинга банков антигена вируса ящура. Данные тесты рекомендовано выполнять по получении (0 год) и в течение каждых 5 лет.

Для соблюдения требований тестирования для хранилищ антигена, необходимо чтобы в наличии были небольшие образцы концентратов, которые бы представляли весь запас. Небольшие аликвоты/исходные растворы антигена ящура обычно состоят из объема, представляющего примерно 1 мг антигена. Эти аликвоты должны храниться рядом с основным антигеном.

## **7. Выпуск вакцин, приготовленных из концентрированных антигенов в экстренных случаях**

В экстренных ситуациях в соответствии с положениями национальных ветеринарных ведомств серия вакцины может быть выпущена до завершения тестирования и определения иммуногенности, если был проведен тест на стерильность основного запаса инактивированных антигенов и всех остальных компонентов вакцины, и если на репрезентативной серии вакцины, приготовленной из того же основного запаса антигенов, проводились тесты на безопасность и иммуногенность. В данном контексте, серия не

считается репрезентативной, кроме случаев, когда она приготовлена из большого количества антигена или антигенов и сформулирована так, как серия, предназначенная для выпуска.

## I) D. ТЕСТЫ НА СООТВЕТСТВИЕ ВАКЦИНЫ

### 1. Введение

Выбор подходящего штамма вакцины является важным элементом контроля ящура; это необходимо при применении программ вакцинации в пораженных ящуром регионах, а также для установления и поддержания запасов вакцинных антигенов, которые могут быть использованы в случае появления новых вспышек ящура.

Вакцинация против одного серотипа вируса ящура не обеспечивает перекрестную защиту против других серотипов, а также может не полностью обеспечить защиту против других штаммов того же серотипа. Наиболее прямой и надежный метод измерения перекрестной защиты это вакцинация релевантных целевых видов и затем проведение контрольного заражения через контакт с изолятом вируса, против которого необходима защита. При этом будут учитываться и иммуногенность, и перекрестная реактивность.

Однако такой подход требует использование живых вирусов ящура, и необходимо применение соответствующих процедур и практических действий по биобезопасности. Учреждения должны соответствовать необходимым требованиям для патогенных организмов 4 группы защиты, которые обозначены в Главе 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарты для управления биологическим риском в ветеринарных лабораториях и вивариях*. Помимо возникающих проблем с безопасностью, данная процедура проходит медленно, является дорогостоящей и подразумевает проведение специфичных экспертиз, которые наиболее доступны в Референтных лабораториях МЭБ. Использование животных для таких исследований должно быть, по возможности, исключено, в качестве альтернативы используют *in-vitro* тесты.

Существует большое многообразие серологических методов *in-vitro* для определения антигенных различий между штаммами вируса ящура, что позволяет оценить возможную перекрестную защиту между штаммом вакцины и полевым изолятом. Генетическая характеристика и антигенное профилирование, а также эпидемиологические наблюдения могут выявить новые штаммы, для которых потребуется подходящая вакцина, или наоборот, укажут на то, что изолят схож со штаммом, для которого уже имеется информация по соответствующей вакцине. Такие тесты должны выполняться в лабораториях, которые работают согласно стандартам, определенным в Главе 1.1.4 и Главе 1.1.5 *Менеджмент качества в ветеринарных тестовых лабораториях*, а именно в референтных лабораториях МЭБ по ящуре.

Транспортировка образцов должна осуществляться в соответствии с Главой 1.1.3 *Перевозка образцов животного происхождения*.

Иммуногенность вакцины и повторная иммунизация могут повлиять на охват антигенов, который обеспечивает вакцина. Высокоиммуногенная вакцина, которая стимулирует выработку иммунного ответа, может обеспечить сильную защиту от гетерологичных вирусов. Кроме того, бустерные дозы вакцины могут повысить эффективность и, как следствие, расширить антигенный охват, который обеспечивает данная вакцина, хотя проявление полной защиты может быть отсрочено (Ray, 1984).

## **2. Отбор полевых изолятов для вакцинного соответствия**

Для вакцинного соответствия предпочтительно оценить больше одного репрезентативного изолята, полученного во время вспышки заболевания.

Отбор вирусов должен основываться на эпидемиологической информации, например выделении на различных уровнях вспышки заболевания, из различных географических местоположений, или от разных носителей (Alonso et al., 1987). Подтверждение отсутствия качества вакцины в полевых условиях, проявляющееся в снижении уровня защиты, является важным критерием для подбора вакцины. Однако следует тщательно разобраться и в других причинах сбоя вакцины (недостаточный охват, несоблюдение холодового режима, отсутствие бустерной иммунизации, отсутствие дополнительных мер контроля, и т.д.).

Серотип полевого изолята обычно определяют с помощью ИФА или реакцией связывания комплемента, используя тип-специфические серологические реагенты, хотя методы, основанные на MAbs или генетическом типировании, также могут быть использованы. Если количество вирусов не соответствует возможностям лаборатории по использованию методов, описанных в разделе 4 *Тесты на соответствие вакцины*, нужно произвести предварительный отбор изолятов.

Для того чтобы минимизировать риск потери важного образца, нужно произвести предварительный отбор, используя все изоляты, полученные в лаборатории. Рекомендуется пользоваться серологически валидированными методами составления профиля антигенов с моноклональными антителами ИФА или РСК.

Следует воспользоваться секвенированием VP1 для верификации генетической гомогенности популяции вирусных изолятов и генетического расстояния относительно имеющихся вакцинных штаммов.

Появление нового вирусного штамма может сопровождаться внезапным появлением многочисленных вспышек. Изоляты, выделенные в этих эпизоотиях, являются приоритетными для установления вакцинного соответствия. Более того, преобладающие изоляты являются наилучшими кандидатами для проведения исследований на вакцинное соответствие. В отношении изолятов, которые демонстрируют существенные отличия от вакцинных штаммов и не распространены в пределах конкретной вспышки, следует применять активный полевой надзор.

## **3. Выбор вакцинных штаммов для установления соответствия**

Серотип вируса, регион происхождения и любые характеристики полевых изолятов, а также, в случае необходимости, характеристики вакцинного штамма, используемого в регионе происхождения, могут выступить основанием для подбора вакцинных штаммов при проведении теста на вакцинное соответствие. Доступность реагентов для исследования на соответствие определенным вакцинным штаммам может ограничить возможность исследования. Во избежание данной проблемы производителю вакцины следует предоставить, по запросу покупателя вакцины и референтных лабораторий МЭБ, сыворотки крови, полученные в период поствакцинации во время итогового тестирования партии продукта на иммуногенность. Референтным лабораториям МЭБ также рекомендовано обеспечить наличие эталонных сывороток периода поствакцинации, произведенных из релевантных вакцинных штаммов. Тесты на вакцинное соответствие выполняют две задачи. Во-первых, они выступают в качестве руководства при подборе

наиболее эффективного вакцинного штамма для использования в конкретных полевых условиях, для проведения рутинной профилактической вакцинации или для экстренной вакцинации, для которой требования к вакцинному соответствию не обязательно совпадают с требованиями к обычной вакцинации. Вторая цель применения указанных тестов - осуществлять на постоянной основе мониторинг пригодности вакцинных штаммов, хранящихся в стратегических резервах антигенов.

#### **4. Тесты на вакцинное соответствие**

Серологическое взаимодействие между полевым изолятом и вирусом вакцины ('r' значение) можно определить в реакции нейтрализации вируса, ИФА или РСК. Рекомендуется провести одностороннее тестирование (r1) с вакцинной антисывороткой, вместо двустороннего тестирования (r2), для которого также требуется исследование на соответствие антисыворотки полемому изоляту. Использование *in-vitro* нейтрализации является более подходящим способом для прогнозирования *in-vivo* защиты, вызванной вакциной, чем иные способы, основанные на взаимодействии вирус -антитела. Исходя из накопленного опыта лабораторных исследований, можно воспользоваться реакцией нейтрализации вируса с титрованием в шахматном порядке или по иной схеме. ИФА зависит от наличия захватывающих и детекторных антител, подходящих полевым штаммам, но ИФА отличается большей воспроизводимостью, чем РН, и ее можно проводить с инактивированным вирусом. В качестве скрининг-метода можно воспользоваться РСК для выбора штаммов, которые далее пройдут тестирование в РН и ИФА. Можно улучшить воспроизводимость результатов РН путем включения нескольких разведений вируса в тест, чтобы точно определить титр вируса с помощью логистической регрессии.

Для РН и ИФА поствакцинальные сыворотки должны быть получены минимум от пяти голов КРС через 21-30 дней после вакцинации и 21-30 дней после бустерной вакцинации. Для каждой сыворотки устанавливается титр антител к вакцинному штамму. Сыворотки используют или по –отдельности или в пуле, предварительно исключив животных с низким иммунным ответом (Mattion et al., 2009).

##### **4.1.Взаимосвязь между полевым изолятом и вакцинным штаммом**

В качестве стандартного теста рекомендована реакция нейтрализации. При наличии подходящих реагентов или в качестве скрининг-метода можно использовать ИФА. Наилучшим скрининг -методом является РСК, которую используют для отбора штаммов подлежащих тестированию в РН и ИФА.

##### **4.1.1. Тест на вакцинное соответствие с помощью двумерной реакции нейтрализации (в шахматном порядке)**

В данном исследовании используется антисыворотка, полученная против вакцинного штамма. Титры сыворотки против 100 ТЦД 50% гомологичного вакцинного штамма и такой же дозы полевого изолята сопоставляют для определения иммунологического покрытия вакцинным штаммом полевого вируса. Для тестирования каждые 100 мл смеси вирус/сыворотка содержит 100 ТЦД 50 тестируемого вируса.

###### **а) Процедура тестирования**

Процедура схожа с РН (см Раздел В 2.1 *Реакция вирус-нейтрализации*)

К дополнительным биологическим реагентам относятся: моновалентная сыворотка КРС, полученная через 21-30 дней после вакцинации (инактивированная при температуре 56°C в течение 45-60 минут), гомологичный вакцинный штамм; исследуемый вирус, полевой изолят того же серотипа, что и вакцинный штамм.

- i. полевых изолятов на культурах клеток до степени адаптации, вызывающей 100% ЦПД через 24 часа. Количество пассажей следует свести к минимуму. После адаптации необходимо определить титр вируса ( $\log_{10}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл) путем титрования до конечной точки. проводят пассаж
- ii. вакцинного вируса проводят титрование в шахматном порядке в отношении вируса и вакцинной сыворотки, а также обратное титрование вируса. Добавляют клетки и инкубируют при температуре 37°C в течение 48-72 часов после того, как ЦПД определен. для каждого теста и
- iii. вакцинной сыворотки против вакцинного штамма и полевого изолята для каждой используемой вирусной дозы рассчитывают с использованием метода Спирмана-Карбера. Титр вакцинной сыворотки против 100 ТЦД<sub>50</sub> каждого вируса может быть определен методом регрессии. Взаимодействие между полевым изолятом и вакцинным штаммом впоследствии выражаются как 'r' значение: Титры антител

$r_1 = \frac{\text{обратный арифметический титр референтной сыворотки против полевого вируса}}{\text{обратный арифметический титр референтной сыворотки против вакцинного вируса}}$

## b) Интерпретация

*Интерпретация результатов исследований на перекрестную реактивность: принято считать, что в случае реакции нейтрализации показатели  $r_1$  больше 0,3 означают, что полевой изолят в большей степени подобен вакцинному штамму. Следовательно, использование вакцины на основе этого штамма с большой вероятностью вызовет защиту при контрольном заражении полевым изолятом. Однако защита зависит, как от перекрестной реактивности антител, выработанных на вакцину, так и от силы иммунного ответа. На силу иммунного ответа влияет иммуногенность вакцины и количество введенных доз.*

При принятии решения об использовании или неиспользовании вакцин с показателем  $r_1$  ниже 0,3, следует учитывать следующие факторы: наличие наиболее подходящих вакцинных штаммов, иммуногенность вакцины и возможность ее усиления, возможность использовать дополнительные бустерные дозы, возможности дополнения мер по борьбе с болезнью другими зоосанитарными мерами или зависимость борьбы от вакцинации. Совместное воздействие иммуногенности и вакцинного соответствия можно оценить на основе серологического титра вакцинной антисыворотки против полевого вируса, однако,

установление точной степени корреляции с уровнем защиты требует проведения исследования на перекрестную защиту.

В качестве альтернативы, подходящий полевой изолят может адаптироваться и стать новым вакцинным штаммом.

Всегда нужно проводить больше одного исследования. Точность значений 'r', обозначающих различия между штаммами, связана с количеством повторов исследований. На деле, рекомендуется проводить, по крайней мере, три повтора.

#### **4.1.2. Установление вакцинного соответствия с помощью ожидаемого уровня защиты (ЕРР), установленного в одномерной реакции нейтрализации**

Установление вакцинного соответствия на основе ЕРР показателей широко применяется в Южной Америке, где в наличии есть корреляционные таблицы по вакцинным штаммам, используемым в регионе. В этом тесте используется антисыворотка против вакцинного штамма (первая и бустерная вакцинация). Чтобы оценить иммунологическое покрытие полевого вируса вакцинным штаммом, сравнивают титры сывороток против 100 ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл сывороточно-вирусных смесей гомологичного вакцинного штамма с такой же дозой полевого изолята.

##### **а) Процедура тестирования**

Процедура похожа на реакцию нейтрализации вируса (см Раздел В.2.1. Реакция вирус нейтрализации).

Дополнительные биологические реагенты: моновалентная сыворотка КРС, полученная через 21-30 дней после вакцинации и через 21-30 дней после бустерной вакцинации (инактивированная при температуре 56°C в течение 45-60 минут), гомологичный вакцинный штамм; исследуемый вирус, полевой изолят того же серотипа, что и вакцинный штамм. В регионах, где используют мультивалентные вакцины, рекомендуется применять панели сывороток, выращенные на основании вакцины, широко применяемой в программах вакцинации.

- i. полевых изолятов на культурах клеток проводят пассаж до степени адаптации, вызывающей 100% ЦПД через 24 часа. Количество пассажей следует свести к минимуму. После адаптации необходимо определить титр вируса ( $\log_{10}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл) путем титрования до конечной точки.
- ii. Для каждого теста и вакцинного вируса проводят титрование антител против фиксированного количества вируса (100 ТЦД<sub>50</sub> вируса/100 мкл смеси сыворотки/вирус), одновременно с обратным титрованием рабочего вируса. Обратное титрование смесей сыворотки/вирус и вируса проводят в условиях инкубации при 37°C в течение 60 минут, затем вводят на микропланшеты с предварительно отформованными клеточными монослоями. Каждую сыворотку вводят в 4 лунки, используют минимум 6 разведений сыворотки. Микропланшеты инкубируют при 37°C в течение 48 часов под воздействием CO<sub>2</sub>, после чего оценивают ЦПД.
- iii. Титры антител вакцинной сыворотки против вакцинного штамма и полевого изолята рассчитывают с использованием метода Спирмана-Карбера. Титр вакцинной сыворотки против 100 ТЦД<sub>50</sub> каждого вируса можно рассчитать и

выразить на мл. По заранее заданным корреляционным таблицам для каждого отдельного титра нейтрализации определяется отдельный показатель ЕРР, затем рассчитывают средний показатель ЕРР для каждой группы сывороток (вакцинированная и бустерная вакцинация). Иммунологическое покрытие вакцинного штамма выражается через показатель ЕРР.

b) Интерпретация

i) *Интерпретация результатов:*

Для интерпретации результатов необходимо установить корреляцию между титрами *in vitro* и *in vivo* защитой при контрольном заражении относительно 10000  $VID_{50}$  вакцинного вируса. По опыту PANAFTOSA в реализации программ борьбы с ящуром в Южной Америке средний показатель ЕРР на уровне 75% у животных, прошедших бустерную вакцинацию, показывает, что вакцинный штамм подходит для использования в сочетании с надлежащими полевыми мерами по контролю вспышек с тестируемыми полевыми штаммами (корреляционные таблицы для O1 A24 и C3 могут быть предоставлены по запросу PANAFTOSA).

#### 4.1.3. Установление вакцинного соответствия в ИФА

По аналогии рекомендуется воспользоваться ранее описанным в разделе В.2.3 жидкофазным блокирующим ИФА для установления вакцинного соответствия, рассчитывая показатель  $\gamma_1$  и/или ЕРР.

a) Процедура исследования

Процедура похожа на реакцию нейтрализации вируса (см Раздел В.2.3 Жидкофазный блокирующий ИФА).

Дополнительные биологические реагенты: моновалентная сыворотка КРС, полученная через 21-30 дней после вакцинации и через 21-30 дней после бустерной вакцинации (инактивированная при температуре 56°C в течение 45-60 минут), гомологичный вакцинный штамм; исследуемый вирус, полевой изолят того же серотипа, что и вакцинный штамм. В регионах, где используют мультивалентные вакцины, рекомендуется применять панели сывороток, выращенные на основании вакцины, широко применяемой в программах вакцинации.

b) Интерпретация

i) Интерпретация результатов  $\gamma_1$

Было предложено, что в случае жидкофазного блокирующего ИФА показатели  $\gamma_1$  больше 0,4 означают, что полевой изолят в большей степени подобен вакцинному штамму. Следовательно, использование вакцины на основе этого штамма с большой вероятностью вызовет защиту при контрольном заражении полевым изолятом. Однако защита зависит, как от перекрестной реактивности антител, выработанных на вакцину, так и от силы иммунного ответа. На силу иммунного ответа влияет иммуногенность вакцины и количество введенных доз. При принятии решения об использовании или неиспользовании вакцин с показателем  $\gamma_1$  ниже 0,4, следует учитывать следующие факторы: наличие наиболее подходящих вакцинных штаммов, иммуногенность вакцины и

возможность усиления гетерологичных ответов, возможность использовать дополнительные бустерные дозы, возможности дополнения мер по борьбе с болезнью другими зоосанитарными мерами или зависимость борьбы от вакцинации.

#### ii) Интерпретация результатов ЕРР

Для интерпретации результатов необходимо установить корреляцию между титрами *in vitro* и *in vivo* защитой при контрольном заражении относительно 10000  $VID_{50}$  вакцинного вируса. По опыту PANAFTOSA в реализации программ борьбы с ящуром в Южной Америке средний показатель ЕРР на уровне 75% у животных, прошедших бустерную вакцинацию, показывает, что вакцинный штамм подходит для использования в сочетании с надлежащими полевыми мерами по контролю вспышек с тестируемыми полевыми штаммами (корреляционные таблицы для O1 A24 и C3 могут быть предоставлены по запросу PANAFTOSA).

#### 4.1.4. Установление вакцинного соответствия в РСК

РСК, проводимая в пробирке, может быть использована в качестве скрининг-теста для подбора тестируемых штаммов в РН или ИФА. Тестирование проводят по описаниям, указанным в разделе В1. Дополнительные биологические реагенты включают: гипериммунные сыворотки морских свиной против вакцинных штаммов. Титр антител в сыворотках определяется против гомологичного вируса и полевых штаммов. Показатель  $r_1$  рассчитывают по схеме, описанной выше:

$$r_1 = \frac{\text{обратный арифметический титр референтной сыворотки против полевого вируса}}{\text{обратный арифметический титр референтной сыворотки против вакцинного вируса}}$$

*Интерпретация результатов:* принято считать, что показатель  $r_1$  равный или более 0,25 указывает на то, что полевой изолят довольно близок вакцинному штамму. Необходимо провести исследования в РН или ИФА с отобранными штаммами для подтверждения предложенной классификации РСК.

#### 4.2. Тестирование на пригодность для вакцины

Не следует использовать показатель  $r_1$  в отдельности, чтобы подобрать наиболее подходящий вакцинный штамм для полевых условий. В частности, когда данный показатель демонстрирует недостаточное соответствие какого-либо вакцинного штамма, то пригодность вакцины на основе этого вакцинного штамма может быть продемонстрирована тестом контрольного заражения на перекрестную гетерологичную защиту (проводимую по Разделу С.4.3. *Тестирование на идентичность*) у животных, вакцинированных известной вакциной и подвергшихся контрольному заражению (гетерологичным) полевым штаммом. Вакцинируйте минимум семь голов КРС без антител к ящуру, используйте коммерческую дозу вакцины, применяемой в вашем регионе. По истечении 28-30 дней проведите бустерную вакцинацию всех этих животных второй коммерческой дозой в этих же условиях, и вакцинируйте вторую группу (минимум из семи голов КРС) такой дозой

же вакцины и тем же способом. Проведите контрольное заражение двух групп и двух контрольных животных (невакцинированных) через 30 дней, используя 10 000 ВІD 50% (инфицирующая доза в эквиваленте КРС) нового полевого штамма, прошедшего надлежащее титрование. Результаты считают действительными, если у двух контрольных животных обнаруживают поражения на как минимум 3 ногах. Конечные результаты сообщают либо в виде количества животных с защитой (без поражений ног) по отношению к общему количеству животных в группе; или в виде процентной доли, где 100% - общее количество животных в группе. Если результаты в группе единожды вакцинированных животных показывают уровень защиты ниже 50%, а в группе дважды вакцинированных животных уровень защиты ниже 75%, то рекомендовано выбрать более подходящую вакцину.

Применение метода на основе ожидаемого процента защиты (ЕРР) возможно тогда, когда для вакцинного штамма проведены исследования на корреляцию. ЕРР метод уместен в некоторых регионах мира, когда его применяют вместе с эпизоотологическими наблюдениями и активным надзором в полевых условиях. Этот метод измеряет реактивность панели поствакцинальных антисывороток с использованием либо РН, либо ИФА, и связывает серологические титры с вероятностью защиты при контрольном заражении 10000 ВІD50% гомологичным вакцинным штаммом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AHL R., HAAS B., LORENZ R.J. & WITTMANN G. (1990). Alternative potency test of FMD vaccines and results of comparative antibody assays in different cell systems and ELISA. Report of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (Session of the Research Group of the Standing Technical Committee) Lindholm, Denmark (AGA: EUFMD/RG/90); FAO, Rome, Italy, pp 51–60.

ALONSO F.A., CASAS OLASCOAGA R.C., ASTUDILLO V.M., SONDAHL M.S., GOMES I. & VIANNA FILHO Y.L. (1987). Updating of foot-and-mouth disease virus strains of epidemiological importance in South America. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 53, 11–18.

ALONSO A., GOMES M.D., RAMALHO A.K., ALLENDE R., BARAHONA H., SONDHAL M. & OSÓRIO F. (1993). Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. Viral Immunol., 6, 219–228.

AUGE DE MELLO P., GOMES I. & BAHNEMANN H.G. (1989). The vaccination of young cattle with an oil adjuvant footand-mouth disease vaccine. Bol. Centr. Panam. Fiebre. Aftosa, 55, 3–14.

BAHNEMANN H.G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. Vaccine, 8, 299–303.

BERGMANN I.E., MALIRAT V., NEITZERT E., PANIZUTTI N., SANCHEZ C. & FALCZUK A. (2000). Improvement of serodiagnostic strategy for foot and mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot. Arch. Virol., 145, 473–489.

BERGMANN I.E., NEITZERT E., MALIRAT V., ORTIZ S., COLLING A., SANCHEZ C. & CORREA MELO E. (2003). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay

and its use as an epidemiological indicator of foot-and-mouth disease viral activity. *Arch. Virol.*, 148, 891–901.

BROCCHI E., BERGMANN I.E., DEKKER A., PATON D.J., SAMMIN D.J., GREINER M., GRAZIOLI S., DE SIMONE F., YADIN H., HAAS B., BULUT N., MALIRAT V., NEITZERT E., GORIS N., PARIDA S., SORENSEN K. & DE CLERCQ K. (2006). Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 24, 6966–6979.

BROCCHI E., DE SIMONE F., BUGNETTI M., GAMBA D. & CAPUCCI L. (1990). Application of a monoclonal antibody-based competition ELISA to the measurement of anti-FMDV antibodies in animal sera. Report of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (Session of the Research Group of the Standing Technical Committee) Lindholm, Denmark, Appendix 14; FAO, Rome, Italy.

CALLAHAN J.D., BROWN F., CSORIO F.A., SUR J.H., KRAMER E., LONG G.W., LUBROTH J., ELLIS S.J., SHOULARS K.S., GAFFNEY K.L., ROCK D.L. & NELSON W.M. (2002). Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220, 1636–1642.

CAMPOS R.M., MALIRAT V., NEITZERT E., GRAZIOLI S., BROCCHI E., SANCHEZ C., FALCZUK A.J., ORTIZ S., REBELLO M.A. & BERGMANN I.E. (2008). Development and characterization of a bovine serum evaluation panel as a standard for immunoassays based on detection of antibodies against foot-and-mouth disease viral non-capsid proteins. *J. Virol. Methods*, 151, 15–23.

CHENARD G., MIEDEMA K., MOONEN P., SCHRIJVER R.S. & DEKKER A. (2003). A solid-phase blocking ELISA for detection of type O foot-and-mouth disease virus antibodies suitable for mass serology. *J. Virol. Methods*, 107, 89–98.

COTTAM E.M., WADSWORTH J., SHAW A.E., ROWLANDS R.J., GOATLEY L., MAAN S., MAAN N.S., MERTENS P.P.C., EBERT K., LI Y., RYAN E.D., JULEFF N., FERRIS N.P., WILESMITH J.W., HAYDON D.T., KING D.P., PATON D.J. & KNOWLES N.J. (2008). Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog.*, 4 (4), e1000050.

DE DIEGO M., BROCCHI E., MACKAY D. & DE SIMONE F. (1997). The use of the non-structural polyprotein 3ABC of FMD virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.*, 142, 2021–2033.

DOEL T.R. & PULLEN L. (1990). International bank for foot-and-mouth disease vaccines: stability studies with virus concentrates and vaccines prepared from them. *Vaccine*, 8, 473–478.  
FERRIS N.P. & DAWSON M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.*, 16, 201–209.

FERRIS N.P. & DONALDSON A.I. (1992). The World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease: a review of thirty-three years of activity (1958–1991). *Rev. sci. tech. Off. int. epiz.*, 11, 657–684.

FERRIS N.P., NORDENGRABN A., HUTCHINGS G.H., REID S.M., KING D.P., EBERT K., PATON D.J., KRISTERSSON T., BROCCHI E., GRAZIOLI S. & MERZA M. (2009).

Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *J. Virol. Methods*, 155, 10–17.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). *Emerging Diseases of Livestock*. Vol. 1. The Diseases and their Diagnosis, Geering W.A., ed. FAO, Rome, Italy, 43–51.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1997). Potency assessment of inactivated viral vaccines. In: *FAO Animal Production and Health Series No 35. Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for use in Developing Countries*, Mowat N. & Rweyemamu M., eds. FAO, Rome, Italy, 395–409.

GOLDING S.M., HEDGER R.S., TALBOT P. & WATSON J. (1976). Radial immunodiffusions and serum neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res. Vet. Sci.*, 20, 142–147.

GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005a). Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay – Part I. Quality assurance: development of secondary and working standards. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24, 995–1004.

GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005b). Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay – Part II. Quality control: comparison of two charting methods to monitor assay performance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24, 1005–1016.

GORIS N., MARADEI E., D'ALOIA R., FONDEVILA N., MATTION N., PEREZ A., SMITSAART E., NAUWYNCK H.J., LA TORRE J., PALMA E. & DE CLERCQ K. (2008). Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: precision of the “Protection against Podal Generalisation” test. *Vaccine*, 26, 3432–3437.

HAMBLIN C., BARNETT I.T.R. & HEDGER R.S. (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Methods*, 93, 115–121.

HAMBLIN C., KITCHING R.P., DONALDSON A.I., CROWTHER J.R. & BARNETT I.T.R. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. 3. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiol. Infect.*, 99, 733–744.

JULEFF N., WINDSOR M., REID E., SEAGO J., ZHANG Z., MONAGHAN P., MORRISON I.W. & CHARLESTON B. (2008). Foot-and-mouth disease virus persists in the light zone of germinal centres. *PLoS One*, 3 (10), e3434. KÄRBER G. (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Archive für Experimentelle Pathologie Pharmakologie*, 162, 480–483.

KITCHING R.P. & DONALDSON A.I. (1987). Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 6, 263–272. KNOWLES N.J. & SAMUEL A.R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.*, 91, 65–80.

- KNOWLES N.J., WADSWORTH J., BACHANEK-BANKOWSKA K. & KING D.P (2016). VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. sci. tech. Off.int. Epiz.*, 35, 741–755.
- LARSKA M., WERNERY U., KINNE J., SCHUSTER R., ALEXANDERSEN G. & ALEXANDERSEN S. (2009). Differences in the susceptibility of dromedary and Bactrian camels to foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol. Infect.*, 137, 549– 554.
- LOMBARD M. & FUESSEL A.E. (2007). Antigen and vaccine banks: technical requirements and the role of the European antigen bank in emergency foot and mouth disease vaccination. *Rev. sci. tech. Off.int. Epiz.*, 26, 117– 134.
- MACKAY D.K., BULUT A.N., RENDLE T., DAVIDSON F. & FERRIS N.P. (2001). A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, 97 (1–2), 33–48.
- MACKAY D.K.J, FORSYTH M.A., DAVIES P.R., BERLINZANI, A., BELSHAM G.J., FLINT M. & RYAN M.D. (1997). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 16, 446–459.
- MARADEI E., LA TORRE J., ROBIOLO B., ESTEVES J., SEKI C., PEDEMONTE A., IGLESIAS M, D'ALOIA R. & MATTION N. (2008). Updating of the correlation between lpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphthovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*, 26, 6577–6586.
- MATTION N., GORIS N., WILLEMS T., ROBIOLO B., MARADEI E., BEASCOECHEA C.P., PEREZ A., SMITSAART E., FONDEVILA N., PALMA E., DE CLERCQ K. & LA TORRE J. (2009). Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine*, 27, 741–747.
- MCCULLOUGH K.C., DE SIMONE F., BROCCHI E., CAPUCCI L., CROWTHER J.R. & KIHM U. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, 66, 1835–1840.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). Foot-and-mouth disease. Ageing of lesions. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- NEIZERT E., BECK E., AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BERGMANN I.E. (1991). Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of latent persistent infections. *Virology*, 184, 799–804.
- PAIBA G.A., ANDERSON J., PATON D.J., SOLDAN A.W., ALEXANDERSEN S., CORTEYN M., WILSDEN G., HAMBLIN P., MACKAY D.K. & DONALDSON A.I. (2004). Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *J. Virol. Methods*, 115, 145–158.
- PARIDA S., FLEMING L., GIBSON D., HAMBLIN P.A., GRAZIOLI S., BROCCHI E. & PATON D.J. (2007). Bovine serum panel for evaluating foot-and-mouth disease virus non-structural protein antibody tests. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19, 539– 544. PAY T.W.F (1984). Factors influencing the performance of foot-and-mouth disease vaccines under field conditions. In: *Applied Virology*, Kurstak E. ed., Academic Press Inc., New York, USA, 73–86.

PERIOLO O., SEKI C., GRIGERA P., ROBIOLO B., FERNANDEZ G., MARADEI E., D'ALOIA R. & LA TORRE J.L. (1993). Largescale use of liquid-phase blocking sandwich ELISA for the evaluation of protective immunity against aphtovirus in cattle vaccinated with oil adjuvanted vaccines in Argentina. *Vaccine*, 11, 754–776.

REID S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., SAMUEL A.R & KNOWLES N.J. (2000). Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 89, 167–176. REID S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., ZHANG Z., BELSHAM G.J., ALEXANDERSEN S. (2001). Diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay. *Vet. Rec.*, 149, 621–623.

REID S. M., GRIERSON S.S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G H. & ALEXANDERSEN S. (2003). Evaluation of automated RTPCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, 107, 129–139.

ROEDER P.L. & LE BLANC SMITH P.M. (1987). The detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzymelinked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.*, 43, 225–232.

SHAW A.E., REID S.M., EBERT K., HUTCHINGS G.H., FERRIS N.P. & KING, D.P. (2007). Protocol: Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods*, 143, 81–85.

SKINNER H.H. (1960). Some techniques for producing and studying attenuated strains of the virus of foot and mouth disease. *Bull. OIE*, 53, 634–650.

SORENSEN K.J., MADSEN K.G., MADSEN E.S., SALT J.S., NQUINDI J. & MACKAY D.K.J. (1998). Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.*, 143, 1461–1476.

STREBEL K., BECK E., STROHMAIER D. & SCHALLER H. (1986). Characterisation of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesised fusion proteins. *J. Virol.*, 57, 983–991.

VANGRYSPERRE W. & DE CLERCQ K. (1996). Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol.*, 141, 331–344.

VIANNA FILHO Y.L., ASTUDILLO V., GOMES I., FERNANDEZ G., ROZAS C.E.E., RAVISON J.A. & ALONSO A. (1993). Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and protection against generalisation. *Vaccine*, 11–14, 1424–1428.

\* \* \*

NB: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по ящуру (См. Таблицу в Части 4 этого Наземного руководства или веб-сайт МЭБ чтобы получить актуальный список: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против ящура

**NB: ВПЕРВЫЕ ПРИНЯТА В 1990 г., ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОТ 2017**