

## ГЛАВА 3.8.8.

### ВЕЗИКУЛЯРНАЯ БОЛЕЗНЬ СВИНЕЙ

#### РЕЗЮМЕ

Везикулярная болезнь свиней (ВБС) – это заразная болезнь свиней, вызываемая энтеровирусом, характерным признаком которой является появление везикул на копытных венчиках, пятках и, в отдельных случаях, на губах, языке, морде и сосках. Штаммы вируса ВБС могут различаться по степени вирулентности, и болезнь может носить субклинический, легкий или тяжелый характер. Болезнь носит тяжелый характер обычно только в тех случаях, когда свиньи содержатся в условиях повышенной влажности в помещениях, поверхность полов в которых обладает абразивными свойствами. Главной отличительной чертой ВБС является то, что по своим клиническим симптомам эта болезнь неотличима от ящура, и при любых вспышках везикулярной болезни у свиней наличие ВБС должно предполагаться до проведения исследования методом лабораторных анализов или подтверждения факта наличия болезни другим способом. В то же время, наиболее частым случаем, наблюдавшимся в течение последних лет, было заражение при наличии субклинических симптомов.

**Идентификация возбудителя:** В тех случаях, когда у свиней наблюдаются признаки везикулярной болезни, для постановки положительного диагноза достаточной является демонстрация наличия в образцах пораженной ткани или везикулярной жидкости вирусного антигена ВБС с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА). Если количество предоставленных образцов пораженной ткани является недостаточным (менее 0,5 г), или если результаты испытаний являются отрицательными или неоднозначными, может использоваться более чувствительный метод диагностики, такой как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ) или выделение вируса (ВВ) в культурах клеток тканей свиньи. Если в каких-либо зараженных культурах впоследствии развивается цитопатическое действие, демонстрация наличия вирусного антигена ВБС методом твердофазного ИФА или наличия вирусной ДНК методом ПЦР ОТ будет достаточной для постановки положительного диагноза. Субклиническая инфекция может быть обнаружена методом случайного отбора образцов экскрементов, собранных на полу, после идентификации вирусного генома ВБС с помощью методов ПЦР ОТ или ВВ.

**Серологические реакции:** Серологические реакции могут использоваться в качестве вспомогательных методов для подтверждения клинических случаев, а также для идентификации субклинических инфекций. Специфичное антитело к вирусу ВБС может быть идентифицировано с помощью метода микронейтрализации или твердофазного ИФА. Несмотря на то, что процедура микронейтрализации занимает 2–3 дня, она остается доказательным методом обнаружения антитела. У небольшой доли (до 0,1%) находящихся в нормальном состоянии неинфицированных свиней результат серологических реакций на наличие ВБС может быть положительным. Реактивность этих единичных животных с положительной реакцией является временной, и, таким образом, они могут быть отделены от инфицированных свиней путем повторного забора образцов у животного, продемонстрировавшего положительный результат, и у его соратников.

*Требования к вакцинам: В настоящее время доступных вакцин против ВБС в продаже не существует. Соответствующие диагностические и стандартные реагенты имеются в референтных лабораториях.*

## **А. ВВЕДЕНИЕ**

Везикулярная болезнь свиней (ВБС) характеризуется образованием везикул и может носить субклинический, легкий и тяжелый характер в зависимости от вызывающего болезнь штамма вируса, пути заражения и инфицирующей дозы, а также от условий, в которых содержатся свиньи. По своим клиническим симптомам ВБС неотличима от ящура, что является самой главной ее особенностью. В связи с этим крайне важным является разграничение случаев заражения ВБС и случаев заражения ящуром с помощью лабораторных исследований. Последние вспышки ВБС характеризовались как менее тяжелые и протекавшие без клинических признаков; инфекция была обнаружена в процессе проверки образцов в рамках программы эпидемиологического надзора и в рамках процедуры сертификации продукции, предназначенной для экспорта.

Инкубационный период ВБС составляет от 2 до 7 дней, по истечении которых может наблюдаться временное лихорадочное состояние с повышением температуры тела до 41°C. После этого на копытном венчике, как правило, в месте его соединения с пяткой, образуются везикулы. Следствием этого может стать поражение всего копытного венчика, что может привести к потере копыта. В более редких случаях везикулы могут образовываться также на морде, в частности, на ее дорсальной поверхности, на губах, языке и сосках, а на коленях могут появляться неглубокие эрозии. В течение нескольких дней у пораженных вирусом свиней может наблюдаться хромота и потеря аппетита. Выкидыш не является типичным следствием ВБС. Период выздоровления обычно составляет 2–3 недели, и единственным признаком заражения является темная горизонтальная линия на копыте, находящаяся в том месте, где рост был временно прекращен. Клинические симптомы болезни варьируются в зависимости от возраста зараженных свиней, условий их содержания и штамма вируса ВБС, вызвавшего болезнь (Loxam & Hedger, 1983). Болезнь, вызванная штаммами легкой формы, может оставаться незамеченной, в частности, у свиней, содержащихся на траве или на соломе, выстланной глубоким слоем. Более молодые животные подвержены более тяжелым формам болезни, хотя показатели смертности молодняка от ВБС являются очень низкими по сравнению с показателями смертности от ящура. Были зарегистрированы случаи поражения нервной системы, но они не являются типичными. Зараженные свиньи могут выделять вирус из носа и изо рта, а также вместе с экскрементами до 48 часов до появления клинических симптомов. Наибольшее количество вируса производится в течение первых 7 дней после заражения, а выделение вируса из носа и изо рта обычно прекращается в течение 2 недель. Выделение вируса вместе с экскрементами может продолжаться до 3 месяцев. Вирус ВБС крайне устойчив к воздействию факторов инактивации в окружающей среде, и его состояние остается стабильным при значении рН-уровня от 2,5 до 12,0 (Mann, 1981). Это отличает его от вируса ящура, который является очень неустойчивым во внешней среде при значении рН-уровня от 6,0 до 8,0.

Поскольку ВБС может протекать в легкой или субклинической форме, очень важно, чтобы при предоставлении образцов, собранных у животных, у которых имеются подозрение на развитие клинической формы болезни, предоставлялись образцы сыворотки, полученные как у свиней с подозрением на заражение, так и у других, не имеющих очевидных признаков болезни животных. Вирус ВБС может циркулировать, оставаясь необнаруженным до тех пор, пока он не паразитит чрезвычайно чувствительную группу. Исходя из этого, для установления длительности присутствия инфекции в организме необходимо искать признаки сероконверсии к вирусу ВБС у здоровых по внешним

признакам животных. Определение изотипа иммуноглобулинов (М или G) к вирусу ВБС также может помочь в установлении времени заражения.

Клинические симптомы ВБС очень похожи на клинические симптомы ящура. Образцы для выделения вируса или обнаружения антигена должны собираться и передаваться с целью проведения исследований таким образом, как если бы они содержали вирус ВБС, и должны транспортироваться в 0,04 моль фосфатно-солевого буфера (ФСБ), смешанного с глицерином (1/1), при рН-уровне раствора 7,2–7,6, с добавлением антибиотиков, таких как (окончательная концентрация на мл) пенициллин (1 000 международных единиц [МЕ]), неомидина сульфат (100 МЕ), полимиксин В сульфат (50 МЕ) и микостатин (100 МЕ) (Kitching & Donaldson, 1987).

Согласно классификации, вирус ВБС (ВВБС) является энтеровирусом свиней, принадлежащим к семейству пикорнавирусов (*Picornaviridae*). Все изоляты этого вируса относятся к одному серотипу, имеющему четыре различных антигенных/геномных варианта (Broschi *et al.*, 1997), которые последовательно развиваются в различные периоды времени, не пересекаясь друг с другом, за исключением третьего и четвертого вариантов, одновременная циркуляция которых наблюдалась в Италии с 1992 по 1993 год. Все вирусы ВБС, обнаруживаемые с того времени, выделились из единого источника и кластера в уникальную антигенную/геномную линию, соответствующую четвертой и большинству последних групп; тем не менее, внутри этой линии различаются две геномные сублинии (Knowles *et al.*, 2007). Антигенно вирус ВБС относится к способному поражать людей вирусу Коксаки В5. Имеются сообщения о сероконверсии к вирусу ВБС у сотрудников лаборатории, работавших с этим возбудителем болезни. Согласно сообщениям, клиническая болезнь протекала в мягкой форме за исключением единственного случая развития менингита, связанного с заражением вирусом ВБС. Несмотря на это, не было зафиксировано случаев сероконверсии или болезни у фермеров и ветеринарных врачей, работавших с инфицированными свиньями. В экспериментальных условиях не представлялось возможным продемонстрировать процесс передачи вируса Коксаки В5 между свиньями. Соответствующие действия и манипуляции в лаборатории должны выполняться с соблюдением правил обеспечения надлежащей биологической безопасности и контроля уровня загрязнения, определяемого с помощью анализа биологического риска (см. главу 1.1.4. *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*).

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

*Таблица 1. Методы исследования, применяемые для диагностики везикулярной болезни свиней и их целевое назначение*

Метод	Цель						
	Отсутствие инфекции в популяции и восстановление ситуации, характеризующейся отсутствием инфекции после вспышек	Отсутствие инфекции у отдельных животных	Подтверждающая серологическая реакция	Подтверждение клинических случаев	Обнаружение инфекции при наличии субклинических симптомов	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус у отдельных животных
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>							
Выделение вируса	-	+	-	+++	+++	-	-
ПЦР ОТ	-	+++	-	+++	+++	-	-
<b>Выявление иммунной реакции</b>							
Твердофазный ИФА для обнаружения антигена	-	-	-	++	-	-	-
Нейтрализация вируса	-	-	+++	+	+	-	+++
Конкурентный твердофазный ИФА для скрининга антител	+++	-	-	+	+	+++	+++
Метод	Цель						
	Отсутствие инфекции в популяции и восстановление ситуации, характеризующейся отсутствием инфекции после вспышек	Отсутствие инфекции у отдельных животных	Подтверждающая серологическая реакция	Подтверждение клинических случаев	Обнаружение инфекции при наличии субклинических симптомов	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус у отдельных животных
Твердофазный ИФА для идентификации иммуноглобулина G и иммуноглобулина M	+	-	-	+	+	-	+++

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами; – = не подходит для данной цели.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++, формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ПЦР ОТ = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;  
твёрдофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

### 1. Идентификация возбудителя

Любые случаи образования везикул у свиней могут являться признаком ящура. После исключения подозрений на наличие вируса ящура необходимо провести диагностику на наличие ВБС, проведение которой требует наличия оборудования специализированной лаборатории. Страны, не имеющие такого оборудования, должны отправлять образцы на исследование в референтную лабораторию МЭБ, осуществляющую диагностику везикулярной болезни свиней: (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или актуальный список лабораторий на официальном вебсайте МЭБ по адресу: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>. В Северной и Южной Америке параллельно необходимо проводить также испытания на наличие антигена вируса везикулярного стоматита.

<sup>1</sup> Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

Обнаружение антигенов или генома вируса ВБС методами твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ) имеет такую же диагностическую ценность, что и выделение вируса. Благодаря скорости выполнения, твердофазный ИФА и ПЦР ОТ делают выполнение скрининг-тестов подходящим. Несмотря на это, выделение вируса является эталонным методом, который необходимо использовать в тех случаях, когда положительный результат твердофазного ИФА или ПЦР ОТ не связан с обнаружением клинических симптомов болезни, обнаружением сероположительных свиней или прямой эпидемиологической связи с подтвержденной вспышкой болезни.

В случае наличия клинических симптомов исследование необходимо начинать с проверки 10% суспензии материала пораженной ткани, разведенной в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) или в среде из культуры клеток ткани и антибиотиков. Образцы экскрементов используются по желанию для обнаружения вируса в тех случаях, когда имеются подозрения на наличие клинической формы ВБС. Образцы экскрементов могут быть собраны у отдельных свиней или с пола помещения, в котором, согласно имеющейся информации, содержатся или содержались свиньи, зараженные ВБС. Количество вируса в экскрементах обычно бывает незначительным для его обнаружения методом твердофазного ИФА, и, в таком случае, необходимо использовать метод ПЦР ОТ и/или метод выделения вируса. Значительная доля образцов экскрементов, помещенных в культуры клеток, будет способствовать росту других энтеровирусов. Данные вирусы могут быть дифференцированы от вируса ВБС с помощью методов твердофазного ИФА или ПЦР ОТ, однако они способны также опередить рост присутствующего вируса ВБС, что станет причиной ложноотрицательных результатов. Таким образом, при исследовании образцов экскрементов ПЦР ОТ является более чувствительным методом, чем выделение вируса.

## **1.1. Приготовление образцов**

### **1.1.1. Образцы пораженной ткани**

Суспензия готовится путем перетирания образца в стерильном песке с помощью стерильных пестика и ступки с небольшим количеством ФСБ или среды, состоящей из культуры клеток ткани, и антибиотиков. После этого необходимо добавить среду, чтобы получилась приблизительно 10% суспензия. Суспензия очищается центрифугированием с центробежным ускорением 2000 *g* в течение 20–30 минут на высокой скорости центрифуги, после чего собирается надосадочная жидкость.

### **1.1.2. Образцы экскрементов**

Образцы экскрементов (приблизительно 20 г) ресуспендируются в минимальном количестве среды, состоящей из культуры клеток тканей, или в фосфатном буфере (0,04 моль фосфатного буфера или ФСБ). Суспензия гомогенизируется путем интенсивного перемешивания вихревым способом и очищается центрифугированием с центробежным ускорением 2000 *g* в течение 20–30 минут на высокой скорости центрифуги. После этого собирается надосадочная жидкость, которая фильтруется через фильтр с отверстиями диаметром 0,45 мкм.

## **1.2. Выделение вируса**

Часть очищенной суспензии эпителиальной ткани или экскрементов инокулируется на монослой клеток IB-RS-2 или других восприимчивых клеток тканей свиньи, выращенных в соответствующих контейнерах (сосуды/колбы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup>,

вращающиеся пробирки, 24-, 12- и 6-луночные планшеты). Для дифференцированной диагностики (например, ящура) в случае наличия поражений, имеющих клинические признаки, также должны использоваться системы клеточных культур тканей коровы. Как правило, вирус ВБС растет только в клетках тканей свиньи. В среду из культуры клеток ткани добавляется 10% бычьей сыворотки для роста клеток и 1–3% бычьей сыворотки для поддержания роста клеток, а также антибиотики.

Культуры исследуются ежедневно. В случае обнаружения признаков цитопатического действия (ЦПД) собирается надосадочная жидкость, и идентификация вируса осуществляется методом твердофазного ИФА (или другим соответствующим методом, например, ПЦР ОТ). Культуры, продемонстрировавшие отрицательный результат, пересеваются слепым методом через 48 часов или 72 часа, после чего за ними ведется наблюдение в течение последующих 2–3 дней. В случае отсутствия признаков ЦПД после второго пассажа образец регистрируется с отметкой «ВНО» («Вирус не обнаружен»). При выделении вируса из экскрементов, в которых количество присутствующего вируса является низким, может потребоваться третий пассаж культуры клеток тканей.

### **1.3. Иммунологические методы**

#### **1.3.1. Твердофазный иммуноферментный анализ**

Сэндвич-метод непрямого твердофазного ИФА для обнаружения антигена вируса ВБС в качестве метода по выбору заменил реакцию связывания комплемента. Данный метод аналогичен методу, используемому для диагностики ящура. Лунки планшета для твердофазного ИФА покрыты кроличьей антисывороткой к вирусу ВБС. Это сыворотка-ловушка (захватывающая сыворотка). Суспензии образцов для испытаний добавляются в лунки и инкубируются. Соответствующие контрольные образцы также включаются в исследование. Антисыворотка морской свинки к вирусу ВБС для обнаружения данного вируса добавляется на следующем этапе, после чего добавляется антисыворотка кролика к глобулину морской свинки, конъюгированная с пероксидазой хрена. В промежутках между всеми этапами осуществляется интенсивное промывание с целью удаления несвязанных реагентов. Положительная реакция определяется по возникновению цветной реакции на добавление хромогена (например, ортофенилендиамина) и субстрата ( $H_2O_2$ ). Наличие сильных положительных реакций видно невооруженным глазом, однако результаты могут читаться также спектрофотометрическим способом на соответствующей длине волны; в данном случае показание оптической плотности  $\geq 0,1$  над фоном означает положительную реакцию. В качестве альтернативы антисывороткам морской свинки и кролика могут использоваться подходящие моноклональные антитела (МА), нанесенные на лунки планшета для проведения твердофазного ИФА в качестве иммобилизованных антител или конъюгированные с пероксидазой и используемые в качестве идентифицирующих антител. Например, простой сэндвич-метод твердофазного ИФА, выполненный с использованием МА 5В7, выступающего как в качестве иммобилизованного антитела, так и в качестве конъюгированного/идентифицирующего антитела, представляющий собой также эталонный метод для серологического конкурентного твердофазного ИФА, подходит для обнаружения антигена вируса ВБС.

Твердофазный ИФА на основе МА также может использоваться для исследования антигенных вариаций среди штаммов вируса ВБС. Выращенные в культуре клеток тканей вирусные штаммы захватываются кроличьей гипериммунной антисывороткой к вирусу ВБС, адсорбированной до твердой фазы. После этого соответствующие наборы МА вступают в реакцию, и связывание МА с полевыми штаммами сравнивается со связыванием МА с родительскими штаммами. Сильное связывание свидетельствует о

наличии эпитопов, распределенных между родительскими и полевыми штаммами (Broschi *et al.*, 1997).

#### **1.4. Методы распознавания нуклеиновой кислоты**

##### **1.4.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией**

Обратная транскрипция, за которой следует ПЦР (ПЦР ОТ), является полезным методом обнаружения генома вируса ВБС в различных образцах, полученных у животных, демонстрирующих клинические и субклинические симптомы болезни. Было описано несколько методов (Benedetti *et al.*, 2010; Blomstrom *et al.*, 2008; Callens & De Clercq, 1999; Fallacara *et al.*, 2000; Hakhverdyan *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 1997; McMenamy *et al.*, 2011; Nunez *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2004a; 2004b; Vangrype & De Clercq, 1996), в которых используются различные техники экстракции РНК, мишенью которых являются различные области генома вируса ВБС, и используются различные подходы к обнаружению продуктов ДНК-амплификации. Нижеописанный метод устанавливает правила иммуно-экстракции РНК и правила одноступенчатой ПЦР ОТ, мишенью которых является ген 3D ВБС, кодирующий РНК-полимеразу.

В процессе выделения РНК из образцов экскрементов свою частичную эффективность продемонстрировала техника анализа с захватом антигена или антитела с использованием специфичного по отношению к вирусу ВБС МА (Fallacara *et al.*, 2000); в то же время, экстракция РНК может осуществляться также с помощью доступных в продаже комплектов, действие которых основано на хаотропном лизисе соли и аффинности РНК при использовании в качестве основания диоксида кремния. В одноступенчатой ПЦР ОТ обратная транскрипция и ПЦР-амплификация выполняются в одной пробирке на одном этапе, что способствует минимизации необходимого времени и снижению риска загрязнения. В продаже доступен ряд комплектов для одноступенчатой ПЦР ОТ, при использовании которых необходимо следовать инструкциям производителей комплектов; пример использования такого комплекта приведен ниже.

Этот метод подходит для лабораторий, не имеющих сложного оборудования для обнаружения продуктов ДНК-амплификации в масштабе реального времени, однако в тех лабораториях, где такое оборудование имеется, может использоваться подход, описанный в одной из публикаций (Reid *et al.*, 2004a; 2004b), который имеет ряд преимуществ, связанных с простотой использования и низким риском загрязнения продуктами ПЦР. Несмотря на это, в сравнительном исследовании, проводившемся на показавших положительный результат образцах экскрементов, полученных во время множества различных вспышек болезни, ПЦР ОТ зарекомендовала себя как лучший метод диагностики, способный выявить все циркулирующие геномные сублинии, в соответствии с результатами двух анализов методом ПЦР ОТ в масштабе реального времени, мишенью которых является 5'-нетранслируемая область генома, и анализа петлевой изотермической амплификации (ПИА) с обратной транскрипцией (Benedetti *et al.*, 2010).

##### **1.4.2. Иммуноэкстракция РНК**

i) Иммуноэкстракция РНК: покройте лунки планшета для проведения твердофазного ИФА насыщенным раствором МА 5В7 (200 мкл на лунку, разведенных в карбонатно-бикарбонатном буфере) и осуществляйте инкубацию в течение ночи при температуре 4°C. Трижды промойте планшеты ФСБ. Используйте планшеты незамедлительно или храните их при температуре -20°C в течение срока, составляющего до 2-3 недель, или в течение более длительного периода при условии стабилизации.

ii) Распределите каждый образец (суспензию экскрементов) на три лунки планшета, покрытые 5В7 (200 мкл на лунку, всего 600 мкл образца).

iii) После инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C с очень медленным перемешиванием трижды промойте лунки ФСБ. Промывка осуществляется вручную во избежание перекрестного загрязнения между лунками.

iv) Экстракция РНК производится из каждого образца путем добавления лизирующего буфера объемом приблизительно 100 мкл на лунку (4 моль гуанидин тиоцианата, 25 ммоль цитрата натрия, рН 7, 0,5% средства «Саркосил» (Sarkosyl)). Инкубируйте лунки в течение 3–5 минут и восстановите образец из трех лунок (всего 300–350 мкл), после чего перенесите материал в одну пробирку.

v) После этого осуществляется осаждение РНК путем добавления смеси из 750 мкл абсолютного этанола и 35 мкл 3 моль ацетата натрия (рН 5,2); содержимое лабораторных сосудов перемешивается вихревым способом и инкубируется при температуре –20°C в течение минимум 1 часа (также может потребоваться продленное осаждение в течение ночи при температуре –20°C).

vi) Центрифугируйте образец с центробежным ускорением 15 500–16 000 g в течение 30 минут при температуре 4°C, после чего будет виден осадок, который необходимо промыть 500 мкл 70% холодного этанола (центрифугированного со скоростью 13 000 оборотов в минуту в течение 10 минут при температуре 4°C) и высушить.

vii) Ресуспендируйте осадок РНК в 20 мкл диэтилпилокарбонатной воды или доступной в продаже воды, свободной от рибонуклеаз.

ПРИМЕЧАНИЕ: В качестве альтернативы анализу с захватом антигена или антитела может применяться метод экстракции РНК с помощью доступных в продаже комплектов.

#### 1.4.2.1. Одноступенчатая ПЦР ОТ

Следующее описание может понадобиться для корректировки характеристики в соответствии с определенными используемыми реагентами.

a) Составьте смесь для реакции (20 мкл – окончательный объем для каждого образца для испытаний)

Вода, свободная от рибонуклеаз	10,75 мкл
5×буфер ПЦР ОТ	5 мкл
Смесь дНТФ (10 ммоль каждого дНТФ)	1 мкл
Прямой праймер pSV DV-SS4 – 10 пкмоль/мкл*	1 мкл
Обратный праймер pSV DV-SA2 – 10 пкмоль/мкл*	1 мкл
Ингибитор рибонуклеазы	0,25 мкл (эквивалентно 5 Единицам)
Смесь ферментов ПЦР ОТ	1 мкл

\*Последовательность праймера: pSV DV-SS4 5'-TTC-AGA-ATG-ATT-GCA-TAT-GGG-G-3'  
pSV DV-SA2 5'-TCA-CGT-TTG-TCC-AGG-TTA-CY-3'

b) Добавьте 5 мкл каждой матричной РНК в 20 мкл реакционной смеси.

c) Выполните следующую процедуру в термоциклере:

Один цикл при температуре 50°C в течение 30 минут (этап обратной транскрипции)

Один цикл при температуре 95°C в течение 15 минут (этап начальной активации)

40 циклов при температуре 94°C в течение 20 секунд (этап денатурации), при температуре 60°C в течение 20 секунд (этап нормализации), при температуре 72°C в течение 45 секунд (этап элонгации)

Один цикл при температуре 72°C в течение 10 минут (этап конечной элонгации).

d) Смешайте 20 мкл аликвот каждого образца с 4 мкл окрашивающего раствора и поместите на 2% агарозный гель. После завершения процедуры электрофореза положительный результат определяется по наличию в геле фрагмента 154 бп гена полимеразы (3D) РНК ВБС. В качестве альтернативы, гель может быть окрашен после процедуры электрофореза с целью снижения уровня загрязнения оборудования окрашивающим раствором.

### 1.4.3. Секвенирование

Сравнительный анализ последовательностей генома вируса является полезным при определении отношений между изолятами вируса ВБС. Посредством определения последовательностей гена 1D, кодирующего главный структурный белок VP1, или гена 3D стало возможным группировать штаммы вируса ВБС в соответствии с гомологией их последовательностей и устанавливать эпидемиологические связи между штаммами, вызывающими болезнь, в различных областях или в различные периоды времени (Brocchi *et al.*, 1997). База данных последовательностей гена 1D и 3D вирусов ВБС хранится в референтной лаборатории МЭБ, находящейся в г. Пирбрайт (Великобритания), и в референтной лаборатории МЭБ, находящейся в г. Брешиа (Италия), соответственно.

## 2. Серологические реакции

Серологические реакции используются для подтверждения в лабораторных условиях вспышек болезни, для осуществления серологического контроля и сертификации свиней, предназначенных для экспорта. ВБС часто диагностируется исключительно на основании результатов серологических реакций. По причине субклинического или мягкого характера болезни, часто подозрение в наличии болезни впервые возникает после проведения стандартных серологических исследований на наличие болезни или с целью сертификации продукции, предназначенной для экспорта. Исследование методом нейтрализации вируса (НВ), реакция двойной иммунодиффузии, реакция радиальной иммунодиффузии, испытание методом встречного иммуноэлектрофореза и методом твердофазного ИФА были проведены и описаны в целях обнаружения антител к вирусу ВБС (Brocchi *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1983; Golding *et al.*, 1976). Несмотря на это, метод НВ и метод твердофазного ИФА являются лишь общепринятыми техниками. НВ представляет собой общепринятый стандартный метод испытания, который, тем не менее, имеет недостаток, заключающийся в том, что его проведение занимает 2–3 дня и требует наличия специального оборудования для работы с культурами клеток тканей. Твердофазный ИФА является более быстрым методом исследования, который может быть легче стандартизирован. Небольшая доля сывороток, полученных у животных, ранее не заражавшихся вирусом ВБС, может оказать положительное воздействие на результаты серологических исследований на наличие антител к вирусу ВБС. Конкурентный твердофазный ИФА с использованием МА 5В7 (КИФА-МА) представляет собой надежную технику обнаружения антител к вирусу ВБС (Brocchi *et al.*, 1995; Heckert *et al.*, 1998). Схожие результаты получены с помощью других твердофазных ИФА (Chenard *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 2005). Результаты исследования методом КИФА-МА небольшого количества (0,2%–0,4%) сывороток, полученных у здоровых свиней, являются пограничными или положительными и должны быть перепроверены с помощью метода НВ. Приблизительно до 50% этих сывороток также продемонстрирует положительный результат при анализе методом НВ (т. е. 0,1–0,2% от исходной совокупности). Животные, демонстрирующие положительный результат при проверке методом твердофазного ИФА и отрицательный результат при проверке методом НВ, считаются неинфицированными. Повторный забор образцов производится у животных, продемонстрировавших

положительных результатов по обоим исследованиям, а также в когортах. Постоянный или понижающийся титр у животных, продемонстрировавших положительный результат, и отсутствие антител к вирусу ВБС в когортах, являются подтверждением статуса «единичного животного с положительной реакцией» для животного, продемонстрировавшего положительный результат. Факторы, отвечающие за статус «единичного животного с положительной реакцией», неизвестны. Серологическая перекрестная реактивность с вирусом ВБС может возникать вследствие заражения другим, еще не идентифицированным, пикорнавирусом или вследствие других неспецифических факторов, присутствующих в сыворотке. Определение изотипа антитела, присутствующего в положительных сыворотках (Broschi *et al.*, 1995), также может быть полезным, поскольку сыворотки, полученные у «единичных животных с положительной реакцией» обычно содержат исключительно иммуноглобулин М и не преобразуют его в иммуноглобулин G (De Clercq, 1998). Твердофазные ИФА, специфичные к изотипам иммуноглобулина М и G, также могут быть полезными для оценки времени нахождения инфекции в организме свиньи или в инфицированных помещениях. Наличие иммуноглобулина М, как в отдельности, так и вместе с иммуноглобулином G, является свидетельством недавнего заражения и вирусовыделения, в то время как обнаружение только иммуноглобулина G свидетельствует о более давнем заражении (Broschi *et al.*, 1995).

## 2.1. Нейтрализация вируса

Количественный микроанализ методом НВ на наличие антител к вирусу ВБС выполняется с использованием клеток IB-RS-2 (или других подходящих восприимчивых клеток тканей свиньи) на плоскодонных микротитрационных планшетах для культур клеток тканей.

Вирус выращивается на монослоях клеток IB-RS-2 и хранится при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  после добавления равного объема глицерина. Было обнаружено, что вирус ВБС сохраняет устойчивость в этих условиях как минимум в течение 1 года. Перед началом испытания сыворотки инактивируются при температуре  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут. Подходящей средой для данного исследования является полная среда Игла/ЛЮН с антибиотиками.

Данное испытание представляет собой равнообъемный анализ с использованием сосудов объемом 50 мкл:

- i) Начиная с разведения 1/4, сыворотки разводятся сериями двойных разведений на планшете, по два ряда лунок на одну сыворотку при объеме 50 мкл.
- ii) Добавляется предварительно титрированный вирус; каждая суспензия вируса объемом 50 мкл содержит около 100 полуинфицирующих доз культуры ткани (цитопатических доз 50% – ЦПД50).
- iii) Контроль включает в себя как минимум слабоположительную и отрицательную сыворотки, контроль с клетками, контроль со средой и титрирование вируса, используемые для вычисления фактического титра вируса, применяемого в испытании.
- iv) Инкубируйте при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа на накрытых предметных стеклах (накрытом планшете).
- v) Клеточная суспензия в пропорции 10<sup>6</sup> клеток/мл приготавливается в среде, содержащей 10% бычьей сыворотки, используемой для роста клеток. В каждую лунку добавляется по 50 мкл клеточной суспензии.

vi) Планшеты (предметные стекла) накрываются и герметично заклеиваются самоклеющейся пленкой, после чего инкубируются при температуре 37°C в течение 2–3 дней. В качестве альтернативы планшеты (предметные стекла) можно накрывать свободно надевающимися крышками и инкубировать в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при температуре 37°C в течение 2–3 дней.

vii) Наблюдение под микроскопом целесообразно осуществлять спустя 48–72 часа; окончательную фиксацию и окраску предметных стекол можно выполнить на третий день. Фиксация осуществляется с помощью 10% раствора формалина и соляного раствора в течение 30 минут. Окрашивание осуществляется путем погружения в раствор, состоящий из 0,05% метиленового синего и 10% формалина в течение 30 минут. Предметные стекла промываются водопроводной водой. Показателем положительного результата является окрашивание клеточных пластов в синий цвет (при котором вирус нейтрализован, а клетки остаются неповрежденными), в то время как пустые лунки (в которых вирус не был нейтрализован) являются показателем отрицательного результата.

viii) Интерпретация результатов

Испытание считается действительным в том случае, когда количество вируса, фактически использованного на одну лунку находится между 101,5 и 102,5 ЦПД50, а положительные контрольные (стандартные) сыворотки находятся в пределах двойного значения ожидаемого для них титра. Титры выражаются в виде окончательных разведений сыворотки, содержащейся в смеси сыворотки и вируса, где 50% лунок защищены. Лаборатории должны сами устанавливать свои предельные титры, исходя из обоих результатов, полученных в отрицательной группе, и результатов, полученных с помощью контрольных реагентов, которые можно получить в референтных лабораториях МЭБ, в частности, низкоположительной сыворотки, определяющей самый низкий уровень антител, который лаборатория должна обязательно считать положительным.

## 2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ

Твердофазный ИФА, разработанный Брокки с соавторами (Broschi *et al.*) (1995): антиген вируса ВБС захватывается и привязывается к твердой фазе с помощью МА 5В7. После этого оценивается способность тест-сывороток ингибировать связывание МА 5В7, конъюгированного с пероксидазой, с захваченным антигеном. Наконец, количество связанных конъюгированных МА определяется путем добавления субстрата и хромогена.

i) Планшеты для твердофазного ИФА покрываются МА 5В7 в объеме 50 мкл на лунку при насыщающем разведении в карбонатном/бикарбонатном буфере, рН 9,6, после чего в течение ночи осуществляется инкубация при температуре 4°C.

ii) Планшеты трижды промываются ФСБ, содержащим 0,05% полисорбата Твин 20, после чего 50 мкл антигена вируса ВБС (вирус ВБС выращен в клетках IB-RS-2, очищен, отфильтрован и инактивирован с помощью бинарного этиленмина) при заранее определенном оптимальном разведении добавляется в каждую лунку. Оптимальное разведение антигена определяется путем титрования методом «шахматной доски» антигена и конъюгированного МА, что позволяет определить рабочее разведение, дающее коэффициент поглощения верхней части линейной области кривой титрования антигена (в промежутке между 1,5 и 2,0 единиц оптической плотности). После этого планшеты инкубируются в течение 1 часа при температуре 37°C.

iii) После трех дополнительных промывок 50 мкл тест-сыворотки (инактивация неуместна) и контрольная сыворотка инкубируются с захваченным антигеном в течение 1 часа при температуре 37°C. Сыворотки могут испытываться при однократном разведении (1/7,5) или титроваться. В последнем случае, трехкратные разведения сывороток выполняются непосредственно в лунках для твердофазного ИФА путем добавления 10 мкл сыворотки в 65 мкл буфера (разведение 1/7,5), после чего 25 мкл переносится в последовательные лунки, содержащие 50 мкл буфера, перемешивается и, наконец, 25 мл выливается. При проведении spot-теста разведение отбора 1/7,5 выполняется путем добавления 7 мкл каждой тест-сыворотки (и контрольных сывороток) в 45 мкл буфера, предварительно распределенного по лункам.

iv) По завершении инкубации в течение 1 часа по 25 мкл оптимального разведения конъюгированного пероксидазой МА 5В7 (см. пункт ii выше) добавляется в каждую лунку, после чего планшеты инкубируются при температуре 37°C в течение еще 1 часа.

v) После завершающей серии промывок путем распределения раствора субстрата (например, 0,5 мг/мл ортофенилендиамина в фосфатном/цитратном буфере, рН 5, содержащем 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) по 50 мкл на лунку, создается колориметрическая реакция.

vi) Реакция останавливается через 10 минут путем добавления 50 мкл 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Показатели поглощения считываются на соответствующей длине волны с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Антиген, сыворотки и конъюгат разводятся в ФСБ, рН 7,4, содержащем 0,05% полисорбата Твин 20 и 1% дрожжевого экстракта; в качестве дополнительного компонента буфер для разведения сывороток содержит 1,0% мышинной сыворотки (или, в качестве альтернативы, другой источник мышинных иммуноглобулинов), что позволяет избежать неспецифичного связывания свиной сыворотки с МА 5В7, либо нанесенным на планшет, либо конъюгированным с пероксидазой.

vii) Контрольные материалы: Четыре лунки на каждом планшете, содержащие все реагенты за исключением тест-сывороток, подтверждают максимальный уровень поглощения для антигена; отрицательная свиная сыворотка; низкоположительная контрольная (стандартная) свиная сыворотка; по желанию используется также сильноположительная свиная сыворотка в четырех разведениях, предварительно откалиброванная таким образом, чтобы показатель ингибирования составлял  $\geq 50\%$  (см. пункт viii ниже) при самом высоком значении разведения.

viii) Интерпретация результатов: Реакции выражаются в виде процента ингибирования, характерного для тест-сыворотки реакции МА с антигеном вируса ВБС. Сыворотки считаются положительными, когда показатель ингибирования составляет  $\geq 80\%$  при разведении 1/7,5; сыворотки считаются отрицательными, когда показатель ингибирования составляет  $< 70\%$  при разведении 1/7,5; сыворотки считаются сомнительными, когда показатель ингибирования составляет  $\geq 70\%$  и  $< 80\%$  при разведении 1/7,5. Второе разведение (1/22,5) показывает количество антител: показатель ингибирования сильноположительных сывороток составляет  $> 80\%$  при разведениях 1/7,5 и 1/22,5, в то время как показатели ингибирования сывороток  $> 80\%$  при разведении 1/7,5, но  $< 50\%$  при разведении 1/22,5 считаются низкоположительными или пограничными. Все положительные, пограничные и сомнительные сыворотки должны быть подтверждены с помощью испытания методом НВ.

## СТАНДАРТНЫЕ РЕФЕРЕНТНЫЕ СЫВОРОТКИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВБС

В референтной лаборатории МЭБ, находящейся в г. Пирбрайт Великобритании храниться комплект референтных сывороток, проходящих регулярную и тщательную процедуру валидации, проводимую Национальными референтными лабораториями по исследованию ВБС государств-членов Евросоюза. Этот комплект включает в себя низкоположительную сыворотку, определяющую самый низкий уровень содержания антител, при котором результат твердофазного ИФА и нейтрализации вируса обязательно считается положительным (RS01-04-94 или эквивалент). Эквивалент положительных сывороток, выступающих в качестве стандартных референтных образцов, также хранится в референтной лаборатории МЭБ в Италии. МА 5В7 можно получить в находящейся в Италии референтной лаборатории МЭБ, занимающейся исследованием везикулярной болезни свиней.

### С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

В настоящее время в продаже нет вакцин против ВБС.

### ЛИТЕРАТУРА

- BENEDETTI D., PEZZONI G., GRAZIOLI S., BARBIERI I. & BROCCHI E. (2010). Comparative performance of three genome amplification assays for detection of swine vesicular disease virus in experimental and field samples. *In: Proceedings of the First Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD), Lelystad, The Netherlands, 15–17 September 2010, O-2-09.*
- BLOMSTRÖM A., HAKVERD M., REID S.M., DUKES J.P., KING D.P., BELÁK S. & BERG M. (2008). A one step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **147**, 188–193.
- BROCCHI E., BERLINZANI A., GAMBA D. & DE SIMONE F. (1995). Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **52**, 155–167.
- BROCCHI E., ZHANG G., KNOWLES N.J., WILSDEN G., MCCAWLEY J.W., MARQUARDT O., OHLINGER V.F. & DE SIMONE F. (1997). Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987–1994. *Epidemiol. Infect.*, **118**, 51–61.
- CALLENS M. & DE CLERCQ K. (1999). Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J. Virol. Methods*, **77**, 87–99.
- CHENARD G., BLOEMRAAD M., KRAMP S.J.A., TERPSTRA C. & DEKKER A. (1998). Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **75**, 105–112.
- DONALDSON A.I., FERRIS N.P., KNOWLES N.J. & BARNETT I.T.R. (1983). Comparative studies of United Kingdom isolates of swine vesicular disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **35**, 295–300.

DE CLERCQ K. (1998). Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody-based competitive ELISA and isotype specific ELISA. *J. Virol. Methods*, **70**, 7–18.

FALLACARA F., PACCIARINI M., BUGNETTI M., BERLINZANI A. & BROCCHI E (2000). Detection of swine vesicular disease virus in faeces samples by immune-PCR assay. *In: Veterinary Virology in the New Millennium, Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 27–30 August 2000*, pp 173–174.

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

HAKHVERDYAN M., RASMUSSEN T.B., THOREN P., UTTENTHAL A. & BELAK S. (2006). Development of a real-time PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of swine vesicular disease virus. *Arch. Virol.*, **151**, 2365–2376.

HECKERT A., BROCCHI E., BERLINZANI A. & MACKAY D. (1998). An international comparative analysis of a competitive ELISA for the detection of antibodies to swine vesicular disease virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 295–297.

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., WILSDEN G., REID S.M., FERRIS N.P., KING D.P., PATON D.J., FEVEREIRO M. & BROCCHI E. (2007). Reappearance of swine vesicular disease virus in Portugal. *Vet. Rec.*, **161**, 71.

KO Y.-J., CHOI K.-S., NAH J.-J., PATON D.J., OEM J.-K., WILSDEN G., KANG S.-Y., JO N.-I., KIM J.-H., LEE H.-W. & PARK J.-M. (2005). Noninfectious virus-like particle antigen for detection of swine vesicular disease virus antibodies in pigs by enzyme linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 922–929.

LIN F., MACKAY D.K.J. & KNOWLES N.J. (1997). Detection of swine vesicular disease virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **65**, 111–121.

LOXAM J.R. & HEDGER R.S. (1983). Swine vesicular disease: clinical signs, diagnosis, epidemiology and control. *Rec. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **2**, 11–24.

MANN J.A. (1981). Swine vesicular disease. *In: Virus Diseases of Farm Animals, Vol. 2*, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, London, UK, 365–381.

MCMENAMY M.J., MCKILLEN J., REID S.M., HJERTNER B., KING D.P., ADAIR B. & ALLAN G. (2011). Development of a minor groove binder assay for real-time one-step RT-PCR detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **171** (1), 219–224.

NUNEZ J.I., BLANCO E., HERNANDEZ T., GOMEX-TEJEDOR C., MARTIN M.I., DOPAZO J. & SOBRINO F. (1998). A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *J. Virol. Methods*, **72**, 227–235.

REID S.M., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., KING D.P. & ALEXANDERSEN S. (2004a). Evaluation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*, **116**, 169–176.

REID S.M., PATON D.J., WILSDEN G., HUTCHINGS G.H., KING D.P., FERRIS N.P. & ALEXANDERSEN S. (2004b). Use of automated real-time RT-PCR to monitor experimental swine vesicular disease virus infection in pigs. *J Comp. Pathol.*, **131**, 308–317.

VANGRYSPERRE W. & DE CLERCQ K. (1996). Rapid and sensitive polymerase chain reaction based on 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.

\* \* \*

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по диагностике везикулярной болезни свиней: (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики везикулярной болезни свиней, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.