

ГЛАВА 3.1.18.

ЛИХОРАДКА ДОЛИНЫ РИФТ

РЕЗЮМЕ

Описание болезни: Лихорадка долины Рифт (RVF) – это острейшая или острая зоонозная болезнь домашних жвачных животных. Вирус в основном встречается на территории Африканского континента и Аравийского полуострова. Её вызывает единственный серотип передаваемого комарами буньявируса рода флебовирусов. Болезнь чаще всего встречается в климатических условиях, благоприятствующих размножению комаров-векторов, и характеризуется абортами, смертностью молодняка и поражением печени. Наиболее тяжело болезнь протекает у овец, коз и крупного рогатого скота. Небеременные животные более старшего возраста, несмотря на восприимчивость к болезни, более резистентны к её клинической форме. Существуют значительные различия в восприимчивости к RVF у животных различных видов. Верблюды обычно страдают от скрытой инфекции RVF, но уровни внезапной смертности, смертности у молодняка и абортотворности могут быть такими же высокими, как и у крупного рогатого скота.

Люди являются восприимчивыми к RVF и заражаются через контакт с инфицированным материалом (жидкости или ткани животных) или через укусы инфицированных комаров. Возбудитель RVF также вызывал серьёзную болезнь у работников лаборатории, поэтому при работе с ним следует соблюдать надлежащие меры биобезопасности. Рекомендуется вакцинировать работников лабораторий, работающих с этим патогеном.

Идентификация агента: Вирус RVF (RVFV) относится к единственному серотипу буньявируса рода флебовирусов, и его морфологические и физико-химические свойства типичны для буньявирусов.

Вирус может быть идентифицирован методом вирусвыделения, твердофазного иммуноферментного анализа для обнаружения антигена (ИФА), иммунопатологическими

методами. РНК вируса может быть обнаружена в обратной транскриптной полимеразной цепной реакции.

Вирус можно выделять из крови, предпочтительно собранной в антикоагулянт, в течение лихорадочной стадии болезни, или из органов (ткани печени, селезёнки и головного мозга) павших животных, или из органов абортированных плодов. Первичные выделения обычно производятся на клеточных культурах различных типов, таких как клетки почки африканской зелёной мартышки (Vero), клетки почки хомячка (БНК). Альтернативным образом для первичного выделения вируса могут использоваться мышата-сосуны.

Серологические тесты: Специфические антитела можно обнаружить с помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа или при использовании реакции нейтрализации.

Требования к вакцинам: Живые аттенуированные или инактивированные вакцины могут использоваться в странах, где RVF носит эндемический характер, имеется риск заноса вируса. Эти вакцины преимущественно готовятся из аттенуированных штаммов вируса RVF, выращенного в клеточных культурах.

В свободных от RVF странах должны применяться только те вакцины и диагностические тесты, которые используют инактивированный вирус. Работа с живым вирусом проводится специально обученным персоналом в помещениях, соответствующих требованиям биобезопасности с соблюдением надлежащих процедур по биобезопасности.

Существует две справочные лаборатории МЭБ по лихорадке долины Рифт (см. таблицу, приведённую в части 4 данного Руководства по наземным животным).

А. ВВЕДЕНИЕ

Лихорадка долины Рифт (RVF) – это острейшая или острая, лихорадочная, передаваемая комарами, зоонозная болезнь, вызываемая вирусом семейства буньявирусов, рода флэбовирусов. Она обычно проявляется в эпизоотической форме на больших территориях страны после сильных дождей и наводнений и характеризуется высокими уровнями абортов и неонатальной смертности, главным образом среди овец, коз и крупного рогатого скота. Восприимчивость различных пород к RVF существенно различается. Некоторые аборигенные виды африканских животных могут иметь только скрытые инфекции, в то время как экзотические или другие породы могут страдать от тяжёлой

клинической болезни со смертностью и абортами. Восприимчивые небеременные животные более старшего возраста или некоторые другие виды обычно не демонстрируют клинических признаков болезни.

Признаки болезни являются неспецифичными, поэтому трудно распознавать отдельные случаи во время эпидемий (Coackley et al., 1967; Coetzer, 1982; Coetzer & Barnard, 1977; Easterday, 1965; Gedes, 2004; Mansfield et al., 201; Meegan & Bailey, 1989; Swanepoort & Coetzer, 1994; Weiss, 1957). Однако характерной чертой является распространение многочисленных абортов и смертности среди молодых животных, а также болезнь у людей. RVF имеет короткий инкубационный период: 12-36 часов у ягнят. Может развиваться двухфазная лихорадка до 41⁰C и температура может оставаться высокой почти до самой смерти. Поражённые животные вялые, они неохотно двигаются или едят, и у них могут быть увеличенные поверхностные лимфоузлы и боль в животе. Ягнята редко живут более 36 часов после появления признаков болезни. Животные старше 2-недельного возраста могут погибать на острейшей или острой стадии болезни, или у них может развиваться скрытая инфекция. Некоторые животные могут изрыгать пищу и могут демонстрировать кишечное кровотечение или кровавый, неприятно пахнущий понос и окрашенное кровью слизисто-гнойное истечение из носа. Иногда можно наблюдать желтуху, особенно у крупного рогатого скота. В дополнение к этим признакам у взрослых животных можно наблюдать слезотечение, слюноотделение и расстройство секреции молока. В различных вспышках и в разных стадах у суягных овец уровни смертности и абортов варьируют от 5% до почти 100%. Уровень смертности у крупного рогатого скота обычно составляет менее 10%. Верблюды регулярно вовлекаются в эпидемии RVF в Восточной Африке, в Египте и с недавних пор в Мавритании. Клиническая болезнь не проявляется у взрослых верблюдов, но наблюдают внезапную смертность, аборты и раннюю постнатальную смертность. Дифференциальный диагноз включает: блютанг, болезнь Вессельброна, энтеротоксемию овец, эфемерную лихорадку, бруцеллез, вибриоз, трихимоноз, болезнь Найроби овец, инфекционный гидроперикардит, энзоотический аборт овец, ядовитые растения, бактериальную септицемию, чуму мелких жвачных, сибирскую язву и болезнь Шмалленберга.

Поражения печени очень похожи у всех видов; они варьируют, в основном, в зависимости от возраста инфицированного животного (Coetzer, 1982). Самым тяжёлым поражением у абортированных плодов и новорожденных ягнят является средне или сильно увеличенная мягкая рыхлая печень от желтовато-коричневого цвета до красновато-коричневого с

неравномерно сконцентрированными пятнами. Многочисленные серовато-белые некротические очаги неизменно присутствуют в паренхиме, но их бывает трудно разглядеть. У взрослых овец поражения менее тяжёлые, а по всей паренхиме распространены некротические очаги с булавообразную головку от красноватого цвета до серовато-белого. Характерной чертой является геморрагия и отёк стенки желчного пузыря. Поражения печени у ягнят почти неизменно сопровождаются многочисленными небольшими кровоизлияниями в слизистой сычуга. Содержимое тонкого кишечника и сычуга может быть тёмного шоколадно-коричневого цвета в результате присутствия частично переваренной крови. У всех животных селезёнка и периферические лимфоузлы увеличены, отёчны и могут иметь петехиальные кровоизлияния.

При микроскопическом исследовании самым очевидным поражением RVF и у животных, и у людей является некроз печени. У плодов и новорожденных телят и ягнят очаги некроза состоят из плотных скоплений клеточных и нуклеарных остатков, некоторого количества фибрина и небольшого количества воспалительных клеток. Имеет место тяжёлый литический некроз большей части гепатоцитов, и теряется нормальная структура печени. Почти у 50% поражённой печени обнаруживают внутриклеточные тельца включений, которые являются эозинофильными и имеют форму овала или палочки. Наблюдают также минерализацию некротических гепатоцитов. У взрослых животных гепатический некроз является менее диффузным, а для овец желтуха характерна в большей степени, нежели для ягнят (Coetzer, 1982; Swanepoel & Coetzer, 1994).

У людей RVF-инфекции обычно бывают неявно выраженными или ассоциируются с несмертельной, гриппоподобной болезнью в средней или тяжёлой форме (Madani *et al.*, 2003; McIntosh *et al.*, 1980; Meegan, 1981). У небольшого количества пациентов могут развиваться поражения глаз, энцефалит или тяжёлая болезнь печени с геморрагическими проявлениями, которая обычно приводит к смертельному исходу. Вирус RVF может привести к серьёзной инфекции у работников лаборатории. Сотрудники должны вакцинироваться, при условии наличия вакцины. Для применения у людей была разработана инактивированная вакцина. Однако, эта вакцина не зарегистрирована и не подлежит продаже. Она применялась экспериментально для защиты ветеринарных и лабораторных работников, подвергающихся риску воздействия RVF. Подробная информация о заболевании и вакцинации людей доступна на сайте ВОЗ¹. Работа с вирусом RVF должна проводиться при соблюдении надлежащих мер биобезопасности и

¹ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/>

биозащиты, определенных анализом биологических рисков (см. Главу 1.1.4. *Биобезопасность и биозащита. Стандарт для управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и виварии*). Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с инфицированными животными или при проведении патологоанатомических исследований.

Вирус RVF включает один серотип, относящийся к семейству *Bunyaviridae* (род *Phlebovirus*), и имеет морфологические и физико-химические характеристики, типичные для буньявирусов. Это оболочечный, сферический вирус диаметром 80-120 нм. Гликопротеиновые шипы расположены на двухслойной липидной оболочке. Вирус легко инактивируется липидными растворителями и в кислотной среде с уровнем pH ниже 6. Вирус RVF имеет трехсегментный, одноцепочечный, негативно-смысловой РНК-геном и состоит из следующих сегментов: L (большой), M (средний) и S (маленький), каждый из которых содержится в отдельном нуклеокапсиде внутри вириона. Сегмент S является амбисмысловой РНК, т.е. имеет двунаправленное кодирование (Giorgi, 1991).

Существенные антигенные различия между изолятами вируса RVF и пассированными в лабораторных условиях штаммами из многих стран не были обнаружены, но были продемонстрированы различия в патогенности (Bird *et al.*, 2007; Swanepoel *et al.*, 1986).

RVF обычно проявляется в виде эпизоотий в Африке; эти эпизоотии могут охватывать одновременно несколько стран в регионе или постепенно географически распространяться на протяжении нескольких лет. Кроме Африки, крупные вспышки наблюдались на Аравийском полуострове и некоторых островах Индийского океана. Обычно, но не всегда, они следуют за периодическими циклами исключительно сильного дождя, которые могут случаться с периодичностью раз в несколько лет, или после наводнений обширных территорий, способствующих размножению комаров.

Ливни способствуют размножению личинок комаров. Вирус передается *Aedes mosquito* от инфицированных животных, они могут служить вертикальными переносчиками вируса, таким образом, из их личинок могут появиться новые поколения зараженных комаров (Lithium *et al.*, 1985). Так действует механизм сохранения вируса в природе, поскольку яйца комаров могут оставаться жизнеспособными в течение нескольких лет в сухих условиях. При заражении сельскохозяйственных животных вектором передачи и распространения вируса RVF могут служить разные виды комаров.

Низкий уровень неподдающейся обнаружению RVF-активности может иметь место в периоды между эпизоотиями. RVF следует подозревать, если в результате необычно сильных дождей идет массовое размножение популяции комаров, и у животных наблюдают аборт вместе с фатальной болезнью, отмеченной некрозом и кровоизлияниями в печени, что особенно поражает новорожденных ягнят, козлят и телят, и если ей сопутствует гриппоподобная болезнь у работников ферм и людей, занимающихся переработкой сырого мяса.

Во время вспышки следует применять профилактические меры для защиты работников от инфекции, если есть подозрения, что будут производиться манипуляции с инфицированными вирусом RVF животными и продуктами животноводства.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Отбор образцов и их транспортировка должны соответствовать рекомендациям, изложенным в Главе 1.1.2. *Отбор, получение и хранение диагностических образцов* и Главе 1.1.3. *Транспортировка образцов животного происхождения* данного *Наземного руководства*.

При постановке правильного диагноза необходимо всегда использовать ряд методов, основываясь на истории, цели исследования и стадии подозреваемой инфекции. Для окончательной интерпретации необходимо тщательно оценить эпидемиологические, клинические и лабораторные данные.

Все описанные ниже методы тестирования должны быть валидированы в каждой лаборатории, где они используются (см. Главу 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических методов для инфекционных болезней*). Референтные лаборатории МЭБ по RVF должны оказывать техническую поддержку. Таблица 1 содержит общие рекомендации по использованию диагностических методов. Более детальная информация представлена в описаниях ниже.

Таблица 1. Методы тестирования, доступные для диагностики лихорадки долины Рифт, а также их цели

Метод	Цель					
	Обеспечение благополучия популяции (невакцинирован	Обеспечение благополучия	Содействие политике	Подтверждение клинических случаев ²	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных

² Лабораторное подтверждение клинических случаев требует наличия по крайней мере двух положительных результатов двух разных диагностических лабораторных методов тестирования: либо положительных на наличие вируса или вирусной РНК и антител, либо положительных на наличие IgM и IgG, показавших

	ных животных)	отдельных животных до перемещения	ликвидац ии			животны х или популяци й после вакцинац ии
Идентификация возбудителя³						
Выделение вируса в культуре клеток	-	-	-		+++	-
Выделение вируса у мышат-сосунов	-	-	-		+	-
ОТ-ПЦР						
Обнаружение антигена						
Гистопатология и иммуногистохимия						
Обнаружение иммунного ответа						
ELISA (ИФА)	+++	++	+++	++	+++	+++
PRNT (Реакция нейтрализации бляшкообразования)	+++	+++	+++	++	++	+++

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

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

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ; PRNT = реакция нейтрализации бляшкообразования.

1. Идентификация возбудителя

Вирус RVF можно выделять из сыворотки, но предпочтительно выделение из плазмы или крови, собранной в антикоагулянт, во время лихорадочной стадии болезни живых животных, или из печени, селезёнки и головного мозга павших животных или из

повышение титра образцов парных сывороток, отобранных с промежутком 2-4 недель. В зависимости от стадии болезни, обнаруживается вирус или антитела.

³ Рекомендуется применять несколько методов идентификации возбудителя в отношении одного и того же клинического образца.

абортированных плодов. Первичное выделение обычно проводят на различных культурах клеток, либо путем интрацеребрального заражения мышей-сосунов.

1.1. Отбор образцов

Используя соответствующее защитное оборудование для обеспечения биобезопасности персонала, используют примерно 5 мл крови, собранной в антикоагулянт (предпочтительно этилендиамин тетрауксусной кислотой [ЭДТА]) в течение лихорадочной стадии болезни, или примерно 1 см³ печени, селезенки, мозга или продукта аборта, собранных после смерти. При перевозке образцы следует хранить при 0-4⁰С. Если транспортировка в лабораторию занимает более 24 часов, образцы следует замораживать и держать на сухом льду или в замороженных термопакетах. В случае пробы крови, отбирается плазма, которая затем замораживается для транспортировки.

1.2. Выделение вируса в культуре клеток

Могут быть использованы монослои различных клеточных линий, включая клетки почки африканской зелёной мартышки (Vero), почки хомячка (ВНК), и клетки москитов AP61 (Digoutte et al., 1989). Их инокулируют раствором образца, разведенным 1/10, и инкубируют при 37° С в течение 1 часа. Желательно также прививать некоторые культуры последующим 1/100 разведением инокулума. Это необходимо делать во избежание получения дефектных частиц, что бывает в результате применения прививочного материала с очень высоким содержанием вируса. Инокулум удаляют и монослой промывают фосфатно-буферным раствором (ФБР) или культуральной средой. Промывочный раствор удаляют, заменяют свежей культуральной средой и инкубируют при соответствующей температуре. За культурами наблюдают в течение 5-6 дней. Предпочтительно использовать линии клеток млекопитающих, т.к. вирус RVF индуцирует непрерывное цитопатическое действие (ЦПД), характеризующееся округлением клеток и последующим разрушением слоя цельных клеток в течение 12-24 часов. Подтверждение выделения вируса предпочтительно проводить с использованием иммунной метки или полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

1.3. Выделение вируса на мышцах-сосудах.

В целях благополучия животных и биобезопасности этот метод следует по возможности избегать. Приблизительно 1 г гомогенизированной ткани суспензируют в отношении 1/10 в культуральной среде или забуференном физиологическом растворе, рН 7,5, содержащем натрий пенициллин (100 международных единиц [МЕ]/мл), стрептомицина сульфат (1 мг/мл), микостатин (100 МЕ/мл) или фунгизон (2,5 мкл/мл).

Суспензию центрифугируют при 1000 g в течение 10 минут, надосадочную жидкость вводят интрацеребрально 1-5-дневным мышам. Мыши-сосуны должны или погибнуть, или стать явно больными ко 2^{ому} дню.

Подтверждение выделения вируса предпочтительно проводить иммуноокрашиванием или с помощью ПЦР.

1.4. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Экспресс диагноз может быть поставлен при обнаружении вирусной РНК (Sall *et al.*, 2001) при использовании валидированного традиционного метода ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени (Bird *et al.*, 2007; Drosten *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2001; Sall *et al.*, 2001). Эти методы оказались очень полезными во время вспышки RVF в Африке. Они также могут быть использованы для обнаружения РНК вируса RVF в москитных водоемах (Jupp *et al.*, 2000).

После использования данных методов проводят секвенирование отобранных образцов. Ниже предложены протоколы для проведения традиционной ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени. Для дополнительной информации по особым процедурам проконсультируйтесь с референтными лабораториями МЭБ.

1.4.1. ОТ-ПЦР в агарозном геле

Эта процедура используется справочными лабораториями МЭБ. ОТ-ПЦР состоит из трех последовательных процедур: (а) экстракции матричной РНК из тестируемого или контрольного образца и (b) обратной транскрипции экстрагированной РНК, (c) ПЦР амплификации продукта обратной транскрипции и (d) обнаружение продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле.

і) Процедура исследования

РНК экстрагируется при использовании соответствующего химического метода в соответствии с процедурой, рекомендованной производителем коммерческого набора. После завершения выполнения процедуры образцы экстрагированной РНК сохраняют на льду, если необходимо выполнить следующий этап обратной транскрипции. В ином случае, хранят при -20°C или -70°C, используют протокол из Sall *et al.* (2001). Для первого этапа ОТ-ПЦР, используются праймеры NSca (5'-ССТ-ТАА-ССТ-АТС-ААС-3') и NSng (5'-ТА-ТГА-ТGG-АТТ-АСТ-ТТС-С-3').

а) Готовят смесь ПЦР для каждого образца, как описано ниже. Рекомендовано готовить смесь в полном объеме, учитывая количество всех тестируемых образцов, плюс один дополнительный образец.

Смесь воды, свободной от нуклеаз (15, 5 мкл); рабочий буферный раствор ОТ-ПЦР, концентрация 5^x (10 мкл); $MgCl_2$, 25 ммоль (1 мкл); dNTP, 10 ммоль с каждым из dATP, dCTP, dGTP, dTTP (по 1 мкл), праймер NSca, 10 мкМ (2,5 мкл); праймер NSng 10 мкМ (2,5 мкл): *Сычужный фермент*, 5 единиц/мкл (0,25 мкл).

b) Вносят 40 мкл реакционной смеси ПЦР в лунку планшета для ПЦР или микроцентрифужную пробирку для каждого испытуемого образца, затем добавляют 10 мкл РНК (приготовленного на этапе i) и доводят до конечного объема 50 мкл.

c) Планшет или пробирки центрифугируют в течение 1 минуты в соответствующей центрифуге для смешивания содержимого каждой лунки.

d) Помещают планшет в термоциклер для ПЦР амплификации и задают следующую программу:

45° C в течение 30 минут: 1 цикл;

95° C в течение 2 минут: 1 цикл;

94° C в течение 30 секунд, 44° C в течение 30 секунд, 72° C в течение 1 минуты: 40 циклов;

72° C в течение 5 минут: 1 цикл.

e) Смешивают 20 мкл аликвоты каждого продукта реакции ПЦР с 4 мкл окрашивающего раствора и помещают в 1,2% агарозный гель. После проведения электрофореза положительным результатом считается наличие цепочки из 810 пар оснований (242 пар оснований для Клона 13), соответствующей последовательности вируса RVF в кодирующей области NSs сегмента S генома.

Для проведения этапа гнездовой ОТ-ПЦР используются NS3a (5'-ATG-CTG-GGA-AGT-GAT-GAG-CG-3') и NS2g (5'-GAT-TTG-CAG-AGT-GGT-CGT-C-3').

f) Для каждого образца готовят смесь ПЦР, как описано ниже. Рекомендуется готовить количество смеси в полном объеме, рассчитанном для всех тестируемых образцов плюс один дополнительный образец.

Смесь воды, свободной от нуклеаз (35, 5 мкл); реакционный буфер ОТ-ПЦР, концентрация 10^x (5 мкл); $MgCl_2$, 25 мМ (1,25 мкл); dNTP, 10 мМ смеси с каждым из dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 мкл), праймер NS3a (5'-ATG-CTG-GGA-AGT-GAT-GAG-CG-3') и NS2g (5'-GAT-TTG-CAG-AGT-GGT-CGT-C-3'), 10 мкМ (2,5 мкл); *Сычужный фермент*, 5 единиц/мкл (0,25 мкл).

g) Вносят 49 мкл реакционной смеси ПЦР в лунку планшета для ПЦР или микроцентрифужную пробирку для тестирования каждого образца, затем

добавляют 10 мкл ампликона, полученного в результате реакции ОТ-ПЦР с NSca и NSng, и доводят смесь до конечного объема 50 мкл.

h) Центрифугируют планшет или пробирки в течение 1 минуты в соответствующей центрифуге для смешивания содержимого каждой лунки.

i) Помещают планшет в термоциклер для ПЦР амплификации и задают следующую программу:

95° С в течение 2 минут: 1 цикл;

94° С в течение 1 минуты, 55° С в течение 1 минуты, 72° С в течение 1 минуты: 25 циклов;

72° С в течение 5 минут: 1 цикл.

j) Смешивают 20 мкл аликвоты каждого продукта реакции ПЦР с 4 мкл окрашивающего раствора и помещают в 1,2% агарозный гель. После проведения электрофореза положительным результатом считается наличие цепочки из 668 пар оснований (129 пар оснований для Клона 13), соответствующей последовательности вируса RVF в кодирующей области NSs сегмента S генома.

1.4.2. ОТ-ПЦР в реальном времени

Метод ОТ-ПЦР в реальном времени имеет такую же процедуру экстрагирования суммарной РНК из тестируемого или контрольного образца с последующей обратной транскрипцией экстрагированной РНК в соответствии с традиционной процедурой. Протокол адаптирован по Drosten et al. (2002). При использовании коммерческих наборов необходимо следовать инструкциям производителя.

i) Процедура проведения исследования

а) Готовят смесь ПЦР для каждого образца, как описано ниже. Также рекомендуется готовить смесь в полном объеме в количестве, необходимом для всех образцов плюс один дополнительный образец.

Вода, свободная от нуклеазы (1,4 мкл); реакционная смесь мастер-микс ОТ-ПЦР, 2^x концентрация (10 мкл); прямой праймер **RVS** ПЦР в реальном времени: 5'-AAA-GGA-ACA-ATG-GAC-TCT-GGT-CA-3', 10 мкМ (2 мкл); обратный праймер **RVA**s ПЦР в реальном времени: 5'-CAC-TTC-TTA-CTA-CCA-TGT-CCT-CCA-AT-3', 10 мкМ (2 мкл); **RVP: FAM** 5'-AAA-GCT-TTG-ATA-TCT-CTC-AGT-GCC-CCA-A-3' **TAMRA** 20 мкМ (0,2 мкл).

б) 17 мкл реакционной смеси ПЦР вносят в лунку планшета для ПЦР в реальном времени для тестирования каждого образца, затем добавляют 3 мкл приготовленной РНК и доводят объем до 20 мкл.

- с) Планшет вращают в течение 1 минуты в соответствующей центрифуге для смешивания содержимого каждой лунки.
- d) Планшет помещают в аппарат для ПЦР в реальном времени для амплификации ПЦР и задают следующую программу:
45° С в течение 30 минут: 1 цикл;
95° С в течение 1 минуты: 1 цикл;
95° С в течение 5 секунд: 57 ° С в течение 35 секунд: 45 циклов.
- е) Считывание результатов: Для каждой ПЦР реакции нужно определить величину порогового цикла, исходя из участков амплификации (участок сигнала флуоресценции относительно номера цикла); точки разделения могут быть предназначены для разных типов проб. Величины порогового цикла, используемые для обозначения проб как положительных, так и отрицательных к вирусу ящура, должны выявляться отдельными лабораториями, используя подходящие справочные материалы.

1.5. Выявление антигена.

Выявление антигена методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) является тестом иммунозахвата. Образцы тестируют в разных разведениях с соответствующим положительным и отрицательным контролем. Этот тест использовали для исследования проб от человека и животных во время вспышек в Саудовской Аравии и Кении (Madani *et al.*, 2003; Muniyua *et al.*, 2010).

1.5.1. Процедура исследования

Контроли и антисыворотки, использующиеся при проведении этого теста, должны быть обработаны для инактивации вируса RVF, который они могли содержать в момент производства. Эти продукты являются безопасными, учитывая наши возможности выявлять жизнеспособный вирус. Материал, тестируемый на наличие вирусного антигена RVF, может быть потенциально контаминирован жизнеспособным вирусом RVF или другими возбудителями, для которых не существует дифференциального определения. По меньшей мере, должны использоваться надлежащие лабораторные практики. Образцы могут быть инактивированы с помощью соответствующего детергента и при термической инактивации.

- i) Основным методом является сэндвич-анализ захвата двумя антителами, в котором антиген захватывается антителом в твердой фазе и затем обнаруживается

вторым антителом. Затем применяется система обнаружения с использованием (HRPO)-ABTS (2,2'-азинобис-(3-этил-бензтиазолин)-6-сульфониевой кислоты пероксидазы хрена, чтобы определить, какое количество обнаруженных антител сохранилось в твердой фазе системы.

а) Захватывающее (сенсibiliзирующее) антитело (разведенное в соотношении 1/2000 в ФБР [без Tween], pH 7,4 сенсibiliзируют в течение ночи при 4° С; контрольные лунки сенсibiliзируют таким же разведением нормальной жидкости).

Планшеты сенсibiliзируют специфическим противовирусным антителом (доступны в Справочных лабораториях МЭБ или ВОЗ), способным захватывать вирусный антиген из тестируемого образца. Нормальная сыворотка вносится в ряды в качестве контролей для определения неспецифического фона или шума системы. В этом случае используется гипериммунная асцитическая жидкость мышей (HMAF) (также могут быть использованы моноклональные антитела), специфичные для вирусов RVF.

б) Подозрительные образцы и контрольный антиген (разводят в отношении 1/4 и затем четырехкратно разводят вниз по планшету)

Их вносят в сывороточный растворитель, чтобы специфичные вирусные антигены связывались с захватывающим антителом. Сывороточный разбавитель (ФБР, 0,01 М, pH 7,4 с/без тиомерсала) содержит 5% обезжиренного молока и 0,1% Tween 20 для уменьшения неспецифического связывания.

с) Выявление антител

Вносят антитело, с высоким титром для специфического вирусного антигена, чтобы выявить связанный вирусный антиген. В этом эксперименте используют гипериммунную сыворотку кролика против RVF (доступную в справочных лабораториях МЭБ и ВТО), которая обладает высоким титром к вирусу RVF.

д) Анти-кроличьи антитела, конъюгированные с HRPO (коммерческий продукт)

Используется для обнаружения кроличьих антител против RVF, которые связываются с антигеном.

е) Критерии для определения положительных результатов

Имеется стандартный контрольный антиген, который используется в стандартных серийных разведениях. Это в результате дает стандартную кривую, которая определяет пределы обнаружения для теста. Группу стандартных тканей и образцов, не контаминированных антигеном, исследуют для определения фона анализа и пределов, при котором стандарт был положительным. Значения

нормальных контролей используют для вычисления среднего и стандартного отклонения случайного фона, ожидаемого для отрицательных образцов. Образец считается положительным, если значение его оптической плотности (OD) превышает среднее значение на 3 стандартных отклонения нормальных контролей.

1.6. Гистопатология

Гистопатологическое исследование печени пораженных животных должно выявлять характерные цитопатологические изменения, а иммуноокрашивание должно позволять специфическим образом идентифицировать антиген вируса RVF в ткани (Coetzer, 1982; Swanepoel *et al.*, 1986). Это важный диагностический инструмент, так как печень или другая ткань, помещенная в нейтральный буферный формальдегид в полевых условиях, инактивируется (в зависимости от толщины образца и времени фиксации) и не требует холодной цепи, что облегчает проведение манипуляций и транспортировку в лабораторию из отдаленных районов.

2. Серологические тесты

Образцы, отобранные от животных для тестирования антител, могут содержать живые вирусы, и должны быть проведены соответствующие этапы инактивации. Была описана комбинация тепловой и химической инактивации (Van Vuren & Paweska, 2010). Все еще используется реакция иммунофлуоресценции, хотя между RVFV и другими флебовирусами могут возникать перекрестные реакции. Такие методы, как иммунодиффузия в агаровом геле (AGID), радиоиммунологический анализ, реакция гемагглютинации (HI) и реакция связывания комплемента, больше не используются.

Существует несколько анализов для обнаружения антител к RVFV у различных видов животных. В настоящее время наиболее широко используемым методом является ELISA (ИФА) для обнаружения IgM и IgG. Тесты вируснейтрализации были использованы для обнаружения антител к RVFV в сыворотке различных видов. Тесты вируснейтрализации являются высокоспецифичными диагностическими серологическими тестами, но эти тесты могут проводиться только с живым вирусом и не рекомендуются для использования за пределами

эндемичных областей или в лабораториях, где отсутствуют соответствующие средства биозащиты, и персонал не вакцинирован. Тем не менее, разрабатываются и проходят валидацию альтернативные реакции нейтрализации, не требующие обработки высоковирулентного RVFV и не требующие применения серьезных мер биобезопасности.

2.1 Твёрдофазный иммуноферментный анализ ИФА (ELISA)

ELISA – надёжный и чувствительный тест, который может применяться для обнаружения антител к вирусу RVF. ELISA с захватом IgG и IgM доступны для большинства видов животных. ELISA с захватом IgM позволяет диагностировать недавнюю инфекцию.

Некоторые тесты ELISA в различных форматах являются коммерчески доступными, а другие находятся в стадии разработки (Afetine *et al.*, 2007; Cettre-Sossah *et al.*, 2009; Jansen Van Vuren *et al.*, 2007; Madani *et al.*, 2003; Munyua *et al.*, 2010; Paweska *et al.*, 2003; 2005; Van Vuren & Paweska, 2010). Они обычно используются во многих странах для диагностики единичных случаев, управления вспышками и наблюдения.

Ниже приведены два таких теста, которые использовались в Справочной лаборатории МЭБ в Южной Африке. В обоих тестах используют 10% обезжиренное молоко / трис-соль Твин (NFM / TST) в качестве блокирующего и разбавляющего буфера и буфер TST (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин 20) в качестве промывочного буфера (pH 8,0). Реакции останавливают 2 N H₂SO₄.

Рекомбинантный нуклеопротеин (rN) RVFV получают и очищают, как описано Williams *et al.* (2011). Конъюгирование белка с HRPO осуществляется по протоколу Nakane & Akira Kawaoi (1974). Антиген rN остается стабильным в течение до 1 года при 4° C.

Чтобы подготовить планшеты к непосредственному использованию, проводят шахматное титрование захватывающего антитела или антигена с конъюгатом на 96-луночном планшете ИФА для определения минимальной концентрации реагента, которая даст значение OD 0,5-0,6 при считывании результатов при 650 нм после инкубационного периода в течение 20 минут. Это определит, как необходимо разбавить антитело / антиген и конъюгат для сенсibilизации

планшетов и обнаружения связывания антигена / антитела при проведении анализа.

2.1.1. ИФА - IgM

i) Процедура испытания.

a) Каждую лунку 96-луночных ИФА планшетов сенсibiliзируют 100 мкл захватывающего антитела (аффинно очищенного антиовечьего иммуноглобулина кролика IgM1), разведенного до 1 мкг / мл в ФБР (то есть в разведении 1/1000 , если это определено титрованием), и инкубируют в течение ночи при комнатной температуре во влажной камере.

b) Планшеты промывают трижды промывочным буфером.

c) Планшеты блокируют 300 мкл блокирующего буфера и инкубируют в течение 1 часа при 37°C.

d) Трижды промывают планшеты промывочным буфером.

e) Контрольные (положительные и отрицательные) и тестируемые сыворотки разводят 1/100 в блокирующем буфере и добавляют каждую сыворотку в обозначенную лунку в объеме 100 мкл /на лунку.

f) Инкубируют планшеты в течение 1 часа при 37° С. Во избежание засыхания, планшеты помещают во влажные камеры.

g) После этапа инкубации ИФА планшеты трижды промывают промывочным буфером.

h) Конъюгат rN-HRP разводят в соотношении 1/6000 и добавляют 100 мкл в каждую лунку. Используют блокирующий буфер в качестве контроля конъюгата.

i) Планшеты затем инкубируют в течение 60 минут при 37° С.

j) Планшеты промывают, как описано выше для этапа b. Готовый к применению тетраметилбензидиновый (ТМВ) субстрат затем переносят в количестве 100 мкл в каждую лунку, и планшеты оставляют при комнатной температуре на несколько минут до изменения цвета или значений OD 0,5, когда результаты планшета считываются при 650 нм. Следует избегать воздействия прямого света.

k) Реакцию останавливают с помощью 100 мкл стоп-раствора и считывают значения OD с помощью считывателя планшетов ИФА при 450 нм.

l) Интерпретация результатов: результаты выражаются в процентах от положительного контроля сыворотки (PP) с использованием формулы: (среднее значение OD двойной тестовой сыворотки) / (среднее OD положительного контроля) x 100, где положительные и отрицательные значения разделения

определяют с помощью ROC-анализа (анализа рабочих характеристик приемника).

Следует отметить, что значение разделения для ИФА может быть скорректировано для разных целевых популяций, а также для различных диагностических целей (Jacobson, 1998). Значения точек разделения, определенные в ходе проверки в Справочной лаборатории МЭБ в Южной Африке, - следующие: значения PP (%): отрицательные <4; подозрительные 4-5; положительные > 6.

2.1.2. Непрямой ИФА - IgG.

I) Процедура исследования.

а) Каждую лунку 96-луночного планшета ИФА сенсibiliзируют 100 мкл rN, разведенного в 50 mM карбонатного буфера (pH 9,6), с использованием соотношения разведения, определенного предшествующим титрованием, как описано выше; инкубируют в течение ночи при комнатной температуре во влажной камере.

б) Планшеты промывают трижды приблизительно 300 мкл промывочного буфера на лунку.

в) Блокируют планшеты приблизительно 300 мкл блокирующего буфера и инкубируют в течение 1 часа при 37° C.

г) Планшеты трижды промывают с помощью 300 мкл промывочного буфера на лунку.

д) Контрольные (положительные и отрицательные) и тестовые сыворотки разводят 1/100 в блокирующем буфере.

е) Добавляют 100 мкл разведенных сывороток в соответствующие лунки в двух экземплярах.

ж) Инкубируют планшеты в течение 1 часа при 37° C. Для предотвращения засыхания планшеты помещают во влажную камеру.

з) После стадии инкубации, трижды промывают планшеты ИФА промывочным буфером.

и) Разводят конъюгат белка G-HRP в соотношении 1/32 000 в блокирующем буфере и добавляют 100 мкл конъюгата в каждую лунку.

й) Инкубируют в течение 60 минут при 37° C.

k) Планшеты промывают, как описано выше на этапе b. Добавьте 100 мкл готового к использованию субстрата ТМВ в каждую лунку и оставьте планшеты при комнатной температуре в течение нескольких минут, избегая при этом прямого света. Данные планшетов считываются при 650 нм, чтобы определить, достигнуто ли значение OD до 0,4-0,6.

l) Реакцию останавливают 100 мкл стоп-раствора и считывают значения OD с помощью считывателя планшетов ИФА при 450 нм.

m) Интерпретация результатов: результаты выражаются в процентах от положительного контроля сыворотки (PP) с использованием формулы:

(среднее значение OD двойной тестовой сыворотки) / (среднее OD положительного контроля) x 100,

где положительные и отрицательные значения разделения определяют с помощью ROC-анализа (анализа рабочих характеристик приемника).

Следует отметить, что значения точек разделения для ИФА могут быть скорректированы для разных целевых популяций, а также для различных диагностических целей (Jacobson, 1998). Значения точек разделения, определенные в ходе проверки в Справочной лаборатории МЭБ в Южной Африке, - следующие: значения PP (%): отрицательные <4; подозрительные 4-6; положительные > 7.

2.2. Реакция нейтрализации/подавления бляшек

Реакция нейтрализации/подавления бляшек (PRNT) можно использовать для определения наличия антител у животных, инфицированных естественным образом, и у вакцинированных животных. Тест является высокоспецифичным и может быть использован для тестирования сыворотки любых видов животных. Он обычно используется для оценки эффективности вакцины. В качестве вируса контрольного заражения используется нейротропный штамм мозга мыши Smithburn высоко аттенуированного RVFV (Smithburn, 1949) или любой другой, предпочтительно ослабленный, RVFV. Вирус хранится при -80 ° C или 4 ° C в лиофилизированной форме.

PRNT₈₀ (то есть 80% -ное восстановление), проводимое в системе клеточной культуры, обычно принимается в качестве стандартной системы анализа для количественного определения активности нейтрализующего антитела в образцах сыворотки. PRNT может проводиться в 6-луночных, 12-луночных или 24-луночных пластиковых

планшетах. Следующая методика использует 12-луночные планшеты и четырехкратные разведения тестовых сывороток.

2.2.1. Процедура исследования

i) Тестовые сыворотки инактивируют в пробирках в соотношении 1:10 (0,050 мл на 0,450 мл) в течение 30 минут на водяной бане при температуре 56° С.

ii) Готовят пробирки с пятью последовательными четырехкратными разведениями (0,1 мл в 0,3 мл), доводят до разведения 1:10.240 в культуральной среде. Используют стандартные положительные и отрицательные контрольные сыворотки.

iii) Подготавливают вирусную суспензию, рассчитанную для получения приблизительно 100 единиц образования бляшек на 0,1 мл. Добавляют 0,3 мл вирусной суспензии во все пробирки с разведением сыворотки, а также положительные и отрицательные пробирки. Накрывают пробирки и охлаждают в течение ночи при 4° С.

iv) Содержащий монослой клеток 12-луночный пластиковый планшет помечают идентификационным номером для каждого испытуемого образца в соответствии с регистрационным листом: обратное титрование вируса и дублированные лунки для разведений 10, 40, 160, 640, 2560 и 10.240. Планшеты помещают в CO₂-инкубатор (при 37° С и 5 % CO₂) перед инокуляцией.

v) После этого удаляют питательную среду. Начиная с самого высокого разведения в смеси сыворотки и вируса (1:10,240) инокулируют 0,1 мл (100 мкл) в каждую из двух лунок, отмеченных 1:10.240, содержащих сливающиеся монослой. Продолжают посев на планшетах и доводят до разведения 1:10 включительно. Оставляют инокулированные планшеты для абсорбции в течение не менее 1 часа при 37° С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Планшеты встряхивают каждые 15 минут.

vi) Сначала наносят питательно-агарозную среду. Инокулированные клетки покрывают 1,5 мл питательной агарозой (в равном объеме 2 * смеси ЕВМЕ и растопленной 2% агарозы) и оставляют при комнатной температуре. Планшеты переворачивают, когда агароза затвердеет, и помещают в CO₂-инкубатор при 37° С и 5%. CO₂.

vii) За 24 часа до подсчета бляшек во все тестовые лунки добавляют второй слой (0,75 мл), содержащий нейтральный красный краситель. Оставляют для затвердевания слоя в течение 15 минут при комнатной температуре (планшеты не подвергают воздействию света). Планшеты переворачивают и помещают в CO₂-инкубатор при 37° С и 5%. CO₂.

viii) Приблизительно через 24 часа после второго наложения подсчитывают все бляшки в вирусных контролях, панелях и положительных и отрицательных контролях. Титр выражается как самое высокое разведение сыворотки, вызывающее 80% редукцию по сравнению с контрольным количеством вируса.

Положительный контрольный титр будет зависеть от формата разведения, используемого в самом тесте. Если используется четырехкратное разведение сывороток, положительный контрольный титр должен быть в пределах четырехкратного (+ или -) ранее определенного положительного контрольного титра. Титр, который считается положительным для антител к RFVF, варьируется в зависимости от цели теста. Если целью является измерение иммуногенности вакцины, то 1/80 или 1/100 является приемлемым порогом. Если проверять циркуляцию RVFV в популяции, то 1/10 или 1/20 титр у животного можно считать положительным.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. История вопроса

Доступные в настоящее время вакцины против RVF представляют собой либо живые аттенуированные, либо инактивированные вакцины. Национальные регулирующие органы могут предоставить информацию по наличию в конкретной стране.

Таблица 2. Обзор вакцинных штаммов RVF в настоящее время

	Вакцины на основе живого аттенуированного штамма вируса Smithburn	Вакцина на основе живого аттенуированного вируса Клон-13	Инактивированные вакцины	TSI-GSD-200 инактивированная вакцина для человека (в настоящий момент не доступна)
Происхождение изолята	Москитный штамм, Уганда, 1948	Человеческий штамм, 1974	Полевые штаммы (Южная Африка и Египет)	Москитный штамм, Уганда, 1944

Аттенуация	Более чем 200 пассажей в мозге мышей	Естественная делеция в гене NSs	Не применимо	Не применимо
Производственный субстрат	Линия клеток ВНК	Линия клеток Vero	Линия клеток ВНК	Диплоидная линия клеток легкого эмбриона макаки-резус
Объект	с/х животные	с/х животные	с/х животные	человек
DIVA стратегия	Нет	Нет	Нет	Не применимо

1.1. Живая аттенуированная вакцина на основе штамма вируса RVF Smithburn.

Вакцинный вирус получен из первоначального нейротропного штамма Smithburn. Этот штамм не является летальным для взрослых мышей, инокулированных внутрибрюшинно, и безопасен для использования у всех пород крупного рогатого скота, овец и коз (Barnard, 1979; Smithburn, 1949). Однако он может вызвать аномалии плода или аборт у беременных животных. Вакцина на основе штамма вируса RVF Smithburn используется в течение нескольких десятилетий при осуществлении надзора за RVF в Восточной и Южной Африке и на Ближнем Востоке, и до сих пор используется на сегодняшний день в разных эндемичных регионах.

1.2. Вакцина против RVF на основе штамма Клон-13

Клон-13 представляет собой аттенуированный естественным образом штамм, характеризующийся значительной делецией кодирующего NSs гена, для основного фактора вирулентности (Muller *et al.*, 1995). Риск реверсии считается маловероятным. При экспериментальных испытаниях вакцин абортов или побочных эффектов не наблюдалось (Dungu *et al.*, 2010; Hunter & Bouloy, 2001). Он недавно появился в Южной Африке для применения у овец и крупного рогатого скота при однократной схеме использования.

1.3. Инактивированная вакцина против RVF

Выпускаемые в настоящее время формалин-инактивированные вакцины, полученные из полевого штамма RVFV, адаптированы к росту клеточной культуры (Barnard, 1979; Barnard & Botha, 1977). В настоящее время в качестве адьюванта используется гидроксид алюминия. Однако инактивированные вакцины против RVF требуют повторной вакцинации через 3-6 месяцев после первичной вакцинации, за которым

следуют ежегодные ревакцинации. Инактивированная вакцина против RVF также используется во время вспышек, а также у беременных самок, поскольку аттенуированная вакцина на основе Smithburn не подходит для этой группы.

1.4. Инактивированная экспериментальная вакцина для человека

Инактивированная экспериментальная вакцина для человека, которая ранее производилась Институтом Salk (США), больше не выпускается (Meadors, 1986).

Многие другие вакцины-кандидаты либо разрабатываются и апробируются на целевых животных, либо находятся на начальной стадии разработки (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН [FAO], 2011; Morrill *et al.*, 1997a, 1997b).

Существует ряд характеристик продукта, которыми должна обладать эффективная и безопасная вакцина против RVF, и которые необходимо использовать для определения целевого профиля продукта. Элементы целевого профиля продукта для вакцины против RVF должны соответствовать 2ой рекомендации отчета заседания ФАО в 2011 году (ФАО, 2011 г.) и нижеуказанным требованиям.

Основной целью вакцины против RVF является предотвращение эпизоотий и эпидемий у видов, представляющих экономический интерес (восприимчивых видов сельскохозяйственных животных [жвачных] и, возможно, верблюдов), и ограничение воздействия на здоровье животных и населения (Mansfield *et al.*, 2015). Помимо потенциального экономического воздействия, возможно появление некоторых последствий для глобального перемещения животных. Важно различать специфические требования к эндемичным территориям и регионам, свободным от этой болезни.

1.5. Эндемичный регион

Целью является предотвращение и борьба с эпизоотиями и эпидемиями в эндемичных территориях и содействие увеличению животноводческого производства в эндемичных районах. В порядке приоритета характеристиками вакцин являются:

- i) предпочтительно однократная доза, что приводит к длительному иммунитету в течение не менее 1 года;
- ii) предпочтительно иммунитет на всю жизнь после ограниченного количества доз.

1.6. Благополучный или неэндемичный регион

Вакцины будут использоваться либо для профилактики, либо для ответа в случае появления вируса. Ожидаемые характеристики вакцин - следующие: безопасные вакцины с быстрым началом защитного иммунитета и защиты у животных всех возрастов и физиологического статуса. Хотя DIVA (обнаружение инфекции у вакцинированных животных) является важным свойством любой будущей вакцины, требования к DIVA не должны препятствовать или блокировать разработку или лицензирование эффективной вакцины против RVF.

Во всех случаях вакцины должны быть:

- i) безопасными для персонала, задействованного в производстве вакцин, и для пользователей, безопасными для животных на всех физиологических стадиях и с минимальным риском попадания в окружающую среду (потенциальные векторы);
- ii) обладать защитными свойствами для всех видов животных и, по возможности, для всех восприимчивых видов, имеющих экономическое значение, для предотвращения заражения и передачи;
- iii) экономически выгодными для производителей и пользователей, предпочтительно с однократной вакцинацией;
- iv) простыми в использовании (например, доставка без иглы), подходящими для длительного хранения (например, банк вакцин) и легкодоступными.

При проведении манипуляций с RVFV персонал должен работать в помещениях с высокой степенью защиты и быть вакцинированным, при наличии вакцин, чтобы свести к минимуму риск заражения.

Рекомендации по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8 «Принципы производства ветеринарных вакцин». Руководящие принципы, приведенные ниже и в главе 1.1.8, имеют общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

В нижеследующем описании производства вакцин приводится информация о производстве живых вакцин, а также связанная с ней информацией о производстве инактивированных вакцин.

2. Структура производства и минимальные требования к общепринятым вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики посевного вируса

Документально подтверждается точный источник штамма и тип материала, из которого был получен вирус. История *in vitro* пассажирования вируса и информация о компонентах должны регистрироваться в соответствии с главой 1.1.8. Главный посевной вирус (MSV) должен быть исследован на предмет идентичности, чистоты (отсутствие случайных агентов) и безопасность. Характеристика MSV должна быть получена с учетом биологических или генетических параметров, в зависимости от ситуации.

Учитывая адекватную иммуногенность, а также руководствуясь очевидными соображениями безопасности, настоятельно рекомендуется использовать аттенуированные штаммы вируса для производства инактивированных вакцин. Количество пассажей вируса от исходного MSV до конечного продукта не должно превышать пяти (Европейская фармакопея, 2012).

2.1.2. Критерии качества.

Во время процесса должна поддерживаться чистота MSV и клеток, которые будут использоваться для производства вакцины. Посевной вирус должен быть свободен от случайных агентов, бактерий и микоплазмы, что подтверждается тестами, которые, как известно, чувствительны к обнаружению этих микроорганизмов (см. Главу 1.1.9. *Анализ биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*). Аликвота, подлежащая тестированию, должна соответствовать титру, адекватному для производства вакцины, но не такому высокому титру, при котором гипериммунная антисыворотка не может нейтрализовать посевной вирус в ходе проведения теста на чистоту. Посевной вирус нейтрализуется моноспецифической антисывороткой или моноклональным антителом к RVFV, отличными от посевного вируса, и смесь вирус / антитела культивируется на нескольких типах монослоев клеточной линии. Нейтрализованные культуры должны быть пассированы и проверены на наличие чужеродных вирусов, которые могли бы инфицировать клетки или посевной вирус во время предыдущих пассажей. Например, вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV) является потенциальным контаминантом, который вводится с помощью эмбриональной бычьей сыворотки в клеточные культуры. Линия клеток, допустимая для BVDV 1 и 2 типа, рекомендуется в качестве одной из линий клеток, выбранной для оценки MSV. Продукты бовинного происхождения должны быть получены из стран с незначительным риском губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Вакцина, полученная из MSV, должна быть удовлетворительной в отношении безопасности и эффективности для видов, для которых она предназначена.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

i) Живые вакцины

Производство вакцин должно выполняться в соответствии с главой 1.1.8. Посевной вирус продуцируется в культуре клеток, см. Таблицу 2 выше. Количество пассажей MSV должно быть ограничено до пяти. Дозу вируса, используемую для инокуляции клеточной культуры, следует свести к минимуму, чтобы уменьшить потенциал дефектных интерферирующих вирусных частиц. Когда вирус достигнет соответствующего титра, как определено СРЕ или другой утвержденной методикой, урожай вируса может быть очищен. Как правило, вакцина лиофилизируется, желательно, в присутствии подходящего стабилизатора.

ii) Инактивированные вакцины.

Антигены, используемые в инактивированных вакцинах, обычно готовят аналогично живым вакцинам. Вирус, присутствующий в поддерживающей среде, инактивируется с использованием валидированного метода инаktivации, затем может быть в конечном итоге сконцентрирован или очищен и приготовлен с подходящим адьювантом.

В случае, если вирулентный RVFV используется для производства инактивированной вакцины, персонал, проводящий манипуляции с живым вирусом, должен быть вакцинирован, при наличии вакцин, а помещения и практики должны соответствовать высокому уровню биобезопасности, что сводит к минимуму риск заражения персонала и попадания вируса в окружающую среду.

2.2.2. Требования к компонентам

Клеточные линии, используемые для культуры клеток, должны продемонстрировать отсутствие побочных агентов. Все продукты животного происхождения, используемые при производстве и поддержании клеток (т. е. трипсин, эмбриональные бычьи сыворотки), а также для роста вируса, должны

быть свободны от посторонних агентов, при этом особое внимание уделяется наличию BVDV.

2.2.3. Контроль в процессе производства

Урожай вируса можно оценивать по антигенной массе или с помощью теста на инфекционную активность. Стерильность антигенов должна контролироваться на протяжении всего процесса.

Для обеспечения полной инактивации нефасованного материала в каждой партии используется валидированный метод контроля инактивации. В случае инактивированных вакцин, образцы, взятые с регулярными временными интервалами во время инактивации, затем инокулируют в восприимчивую клеточную линию (как используется для производства), они должны демонстрировать полное отсутствие титра на 2/3 от общей продолжительности процесса инактивации.

Для испытаний в культурах клеток 1,0 мл инактивированного урожая инокулируют в не менее 150 см² монослая клеточной культуры. Продукт соответствует тесту, если не обнаружено никаких признаков наличия какого-либо живого вируса или другого микроорганизма.

В конце производства измеряется количество антигена для установления того, что были достигнуты минимальные объемные титры или антигенная масса.

2.2.4. Тестирование партии конечного продукта

i) Стерильность

Конечные продукты следует проверять на отсутствие бактерий, микоплазмы и грибковой контаминации (см. Главу 1.1.9).

ii) Идентичность.

Живой аттенуированный вирус или инактивированный антиген, а также конечный готовый продукт (лиофилизированный или жидкий) должны перед выпуском подвергаться тестированию на идентичность, чтобы продемонстрировать наличие соответствующего штамма RVF.

iii) Безопасность.

Тест на безопасность конечного продукта предназначен для обнаружения любых аномальных локальных или системных побочных реакций. Каждое из, как минимум, двух здоровых серо-негативных целевых животных должно быть

привито рекомендуемой дозой вакцины с использованием рекомендованного способа введения. Животных наблюдают на предмет появления локальных и системных реакций на вакцинацию в течение не менее 14 дней. Любая побочная реакция, связанная с применением вакцины, должна оцениваться, что может послужить причиной отзыва партии. Если тест на эффективность проводится у целевых видов, наблюдение за безопасностью во время этого испытания также может рассматриваться как альтернатива описанному здесь тесту на безопасность партии.

iv) Эффективность партии.

Для живых вакцин эффективность зависит от титра живого вируса. При выпуске партии инактивированных вакцин могут быть использованы непрямые тесты из соображений практичности и благополучия животных, если корреляция соответствовала процентному уровню защиты у целевого животного. Часто непрямые тесты на эффективность включают титрование антител после вакцинации подходящих видов. Могут быть использованы альтернативные методы (масса антигена), если они были надлежащим образом валидированы.

v) Содержание влаги

Содержание влаги в лиофилизированной аттенуированной вакцине не должно превышать 5%.

2.3. Требования к авторизации / регистрации / лицензированию

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины все соответствующие данные, касающиеся производства вакцины и проведения тестов на контроль качества (см. Раздел С.2.2.1 - С.2.2.4 настоящей главы), должны быть представлены регулирующим органам. Эта информация должна быть предоставлена по трем последовательным партиям вакцины в объеме не менее 1/3 от стандартного объема промышленной партии.

Проведение внутренних контролей на производстве является частью производственного процесса.

2.3.2. Требования к безопасности

Для получения разрешения регулирующего органа должны быть получены удовлетворительные результаты тестов на безопасность. Кроме этих испытаний вакцины должны быть протестированы на безопасность в полевых условиях (см. Главу 1.1.8 по полевым испытаниям [безопасность и эффективность]).

i) Живые вакцины

Вакцины должны быть протестированы на возникновение любых патогенных процессов у каждого из целевых видов, заявленных на маркировке.

a) Тест на безопасность у молодых животных (передозировка)

Тест проводят для каждого рекомендуемого способа введения вакцины, используя молодое целевое животное не старше минимального возраста, рекомендованного для вакцинации. Используют вакцинный вирус с наименьшим пассажным уровнем аттенуации в партии вакцины.

Используют не менее восьми здоровых молодых целевых животных, не имеющих антител к RVFV. Каждому животному необходимо вводить такое количество вакцинного вируса, которое не менее чем в 10 раз превышает максимальный вирусный титр, который может содержаться в 1 дозе вакцины. За животными ежедневно наблюдают в течение как минимум 14 дней. Температуру тела каждого вакцинированного животного измеряют, по крайней мере, в течение 3 дней, предшествующих введению вакцины, во время введения, через 4 часа после введения и затем ежедневно в течение как минимум 14 дней. Вакцина соответствует тесту, если среднее значение повышения температуры тела для всех животных не превышает $1,5^{\circ}\text{C}$, ни одно животное не показывает повышение температуры выше чем на $1,5^{\circ}\text{C}$ в течение периода не более 3 дней подряд, и ни одно животное не обнаруживает заметных признаков заболевания или не умирает от причин, связанных с вакциной.

b) Тест на безопасность у беременных животных.

Безопасность должна быть продемонстрирована на разных этапах беременности, если продукт будет использоваться у беременных животных.

Тест с вакцинацией проводят с использованием рекомендованной схемы на нескольких серонегативных животных одинакового возраста и происхождения, количество которых является достаточным для обеспечения желаемого уровня статистической достоверности относительно вероятности побочных эффектов. Восемь животных должны быть протестированы в каждом триместре беременности (то есть всего 24 животных), учитывая, что тератогенный риск RVF является самым высоким в первых двух триместрах беременности (Botros, 2006; Hunter, 2002). Используют вакцинный вирус с наименьшим пассажным уровнем аттенуации в партии вакцины.

Каждому животному необходимо вводить такое количество вакцинного вируса, которое не менее чем в 10 раз превышает максимальный вирусный титр, который может содержаться в 1 дозе вакцины. Клиническое наблюдение за животными проводят ежедневно до момента родов. Образцы крови следует отбирать от новорожденных животных до получения ими молозива.

Тест считается недействительным, если серологическая специфичность не видоизменяется у вакцинированных животных перед родами. Вакцинный вирус соответствует тесту, если во время беременности или в организме животных не отмечаются аномалии. Ни у одного животного не обнаруживают явных признаков заболевания или ни одно животное не умирает от причин, связанных с вакциной.

Вирус вакцины не должен присутствовать в образцах крови новорожденных животных.

с) Отсутствие передачи вируса

Этот тест должен проводиться на наиболее восприимчивых видах животных к RVF, которыми обычно являются овцы.

Используют группу из не менее 12 здоровых ягнят в минимальном возрасте, рекомендованном для вакцинации, и одинакового происхождения, которые не имеют антител к RVFV. Используют вакцинный вирус наименьшего пассажного уровня, который будет присутствовать между MSV и партией вакцины. Вакцинный вирус вводят рекомендованным способом как минимум шести ягнятам в таком количестве, которое эквивалентно не менее чем максимальному вирусному титру, содержащемуся в 1 дозе вакцины.

Используют не менее шести ягнят в качестве контактных контролей. Объединение вакцинированных ягнят и контактных ягнят осуществляют через 24 часа после вакцинации.

Через 45 дней всех ягнят подвергают эвтаназии. Проводят соответствующие тесты на ягнятах для обнаружения антител к вирусу RVF и на контрольных ягнятах для обнаружения RVFV в селезенке и печени. Вакцина соответствует тесту, если антитела обнаружены у всех вакцинированных ягнят, и если антитела и вирус отсутствуют у контрольных ягнят.

d) Реверсия вирулентности.

Это исследование проводится с использованием партии посевного вируса; следует использовать наиболее восприимчивые виды соответствующего возраста и способа введения. Если количество посевного вируса, необходимое для проведения теста, является недостаточным, можно использовать материал наименьшего пассажа, который используется для производства, если он имеется в достаточном количестве. Во время инокуляции животные во всех группах должны быть в возрасте, подходящем для получения штамма. Серийные пассажи выполняются на целевых животных с использованием пяти групп животных, если только не существует причин для проведения большего количества пассажей, или если штамм не исчезнет из испытуемого животного раньше. Размножение вируса *in vitro* не может быть использовано для увеличения количества посевного материала.

Пассажи выполняются с использованием животных, наиболее подходящих для оценки потенциального риска.

Сначала вакцину вводят рекомендованным способом, что, скорее всего, приведет к реверсии вирулентности, используя исходный инокулят, содержащий максимальный титр высвобождения. После этого проводится не менее четырех последующих серийных пассажей на животных целевых видов. Пассажи проводятся таким способом введения, который, скорее всего, приведет к реверсии вирулентности. Этот метод может быть использован, если свойства штамма позволят провести последовательное пассирование через естественное распространение, в противном случае проводится пассирование вируса, и вирус, полученный в последнем пассаже, исследуют на увеличение вирулентности. Для первых четырех групп используется не менее двух животных. Последняя группа состоит из не менее восьми животных. При каждом пассаже в материале,

используемом для пассирования, должно быть продемонстрировано присутствие живого вируса, полученного из вакцины. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы избежать заражения вирусом из предыдущих пассажей. Если вирус не выделяется в каком-либо промежуточном пассаже *in-vivo*, проводят повторное пассирование у десяти животных, используя *in-vivo* пассированный материал последнего пассажа, в котором был получен вирус. Выделенный вирус используется в качестве инокулята для следующего пересева. Если вакцинный вирус не выделяется, эксперимент считается завершенным с заключением, что вирус вакцины не показывает увеличение вирулентности.

Во время исследования проводятся общие клинические наблюдения. Животные в последней группе наблюдаются в течение 21 дня, если не предусмотрено иное. Эти наблюдения включают все соответствующие параметры, характерные для заболевания, которые могут указывать на увеличение вирулентности. Сравнивают клинические признаки и другие соответствующие параметры с теми, которые наблюдаются у животных, участвующих в исследовании, для определения безопасности введения 1 дозы. Если у последней группы животных не выявлено доказательств увеличения вирулентности, дальнейшее тестирование не требуется. В противном случае материал, используемый в первом пассаже, и вирус, выделенный в последнем пассаже, используют в отдельном эксперименте на, по меньшей мере, восьми животных на группу, чтобы непосредственно сравнить клинические признаки и другие соответствующие параметры. Это исследование проводится с использованием такого способа введения, который использовался для предыдущих пассажей. Может быть использован альтернативный способ введения, если это необходимо.

В случае, когда не требуется и не разрешено иное, продукт соответствует требованиям теста, если животное не умирает или не показывает признаки, связанные с вакцинным штаммом, а также не наблюдается никаких признаков повышенной вирулентности у животных последней группы.

e) Экологические соображения.

Если существует риск возможного распространения или заражения нецелевых видов животных через живые вакцины или распространения через векторы, должна быть проведена оценка риска.

f) Меры предосторожности

Модифицированные живые вирусные вакцины могут представлять опасность для вакцинируемого в зависимости от штамма и уровня аттенуации вируса. Производители должны соответствующим образом предупреждать о том, что в случае самоинъекции вакциной следует обратиться за медицинской помощью.

ii) Инактивированные вакцины

a) Тест на безопасность (одной дозы и повторной дозы)

Для получения разрешения регулирующего органа пробная партия инактивированной вакцины должна быть исследована на предмет местной и системной безопасности при каждом рекомендованном способе введения *in vivo* тесте у восьми животных каждого целевого вида. Следует проводить тестирование однократной дозы и повторной + дозы с использованием вакцин, содержащих максимально допустимую полезную нагрузку. Тест повторной дозы должен проводиться по первоначальной схеме вакцинации (например, две инъекции) плюс одна ревакцинация (т. е. в общей сложности три инъекции). Животных наблюдают на предмет появления локальных и системных реакций на вакцинацию не менее чем в течение 14 дней после каждой инъекции. Любая необычная реакция, связанная с вакциной, подлежит оценке и может препятствовать использованию вакцины.

b) Тест на безопасность у беременных животных.

Если продукт будет использоваться у беременных животных, то должна быть продемонстрирована его безопасность на разных этапах беременности. Проводят тест с вакцинацией рекомендованным способом введения с использованием не менее 16 здоровых животных одинакового возраста и происхождения, не имеющих антител к RVFV: восемь в первом триместре беременности и восемь во втором триместре (периоды времени, когда тератогенный риск RVF является самым высоким [Botros, 2006; Hunter, 2002]).

Каждой группе вводят количество вакцины, эквивалентное, по крайней мере, максимальной массе антигена, которая может содержаться в 1 дозе вакцины. Клиническое наблюдение за животными проводят ежедневно до родов.

Тест считается недействительным, если вакцинированные животные не видоизменяют серологическую специфичность перед родами. Вакцина соответствует тесту, если во время беременности или в организме животных не

отмечаются аномалии, и ни у одного животного не обнаружено явных признаков заболевания или ни одно животное не умирает от причин, связанных с вакциной.

с) Меры предосторожности

Инактивированные вакцины против RVFV не представляют опасности для вакцинированных животных, хотя случайное введение может привести к неблагоприятной реакции, вызванной адъювантом и вторичными компонентами вакцины. Производители должны соответствующим образом предупреждать о том, что в случае самоинъекции вакциной следует обратиться за медицинской помощью.

2.3.3. Требования к эффективности

Эффективность вакцины оценивается непосредственно у вакцинированных животных путем определения устойчивости к заражению живым вирусом, при проведении контролируемого исследования вакцинации/заражения животных-хозяев. В ситуациях, когда исследование, связанное с вакцинацией/заражением животного-хозяина, невозможно, выявление нейтрализующих вирус антител путем вакцинации считается показателем эффективности, поскольку нейтрализующие антитела считаются защитными; однако минимальный защитный титр будет варьироваться в зависимости от типа используемого анализа нейтрализации и используемого вируса. Защитный титр может быть определен путем проведения исследования вакцинации/заражения животного-хозяина, а также измерения нейтрализующих антител, тем самым обеспечивая связь титра с эффективностью. В целом, успешное проведение теста у ягненка считается достаточным доказательством качества вакцины, чтобы ее использование было одобрено для использования у других видов животных. В условиях, когда вакцина производится для использования преимущественно у видов, отличных от овец, может быть более целесообразным проверить эффективность вакцины у того же вида. Однако, за исключением крупного рогатого скота, тесты на эффективность у других целевых видов, таких как козы или верблюды, еще не разработаны.

i) Исследование иммуногенности у молодых животных

Следующий тест применяется у овец. Для других видов можно было бы внести соответствующие изменения.

Тест проводится для всех способов введения и метода применения, рекомендованных для вакцинации, в каждом случае используя ягнят минимального рекомендованного возраста. Количество живой вакцины, которую нужно вводить каждому ягненку, не превышает минимальный титр вируса, указанный на маркировке, и вирус имеет наименьший пассажный уровень аттенуации, который будет присутствовать в партии вакцины. В случае инактивированных вакцин следует использовать минимальную антигенную дозу согласно рекомендованной схеме вакцинации.

Для теста используют не менее 16 ягнят, не имеющих антител к RVF.

В случае живой вакцины от ягнят отбирают сыворотки перед вакцинацией, через 7 и 14 дней после вакцинации и непосредственно перед заражением. В случае инактивированной вакцины от ягнят отбирают сыворотки до первой и второй инъекции примовакцинации и во время заражения.

Вакцинируют не менее восьми ягнят согласно рекомендованной схеме. В качестве контролей используют не менее восьми ягнят. Для живых вакцин через 20-22 дней заражают каждого ягненка вирулентным RVFV, используя соответствующий способ введения. В случае инактивированных вакцин, каждого ягненка заражают вирулентным RVFV при соответствующем способе введения через 14 дней после завершения примовакцинации. За ягнятами наблюдают, по крайней мере, ежедневно в течение 14 дней после заражения и проводят мониторинг клинических признаков и вирусной нагрузки путем выделения вируса и постановки количественной ОТ-ПЦР в крови.

Тест считается недействительным, если антитела к RVFV в сыворотке контрольных животных указывают на то, что во время теста наблюдалась интеркуррентная инфекция вирусом.

Вакцина соответствует тесту, если в течение периода наблюдения после заражения наблюдается значительное сокращение продолжительности и титра виремии и заметное снижение клинических признаков (если вирус, использовавшийся для заражения, вызывает такие симптомы) у вакцинированных ягнят по сравнению с контролями.

ii) Тест на иммуногенность у беременных животных.

Если фармакопеей конкретной страны не предусмотрено иное, беременных животных тестируют на иммуногенность. У овец применяют следующий тест. Для других видов могут быть внесены соответствующие изменения.

Тест проводится для каждого способа введения и метода применения, рекомендованных для вакцинации, с использованием в каждом случае беременных овцематок, имеющих минимальный рекомендованный возраст. Количество живой вакцины, которую нужно вводить каждой овцематке, не должно превышать минимальный титр вируса, указанный на маркировке, и вирус имеет наименьший пассажный уровень аттенуации, который будет присутствовать в партии вакцины. В случае инактивированных вакцин следует использовать минимальную антигенную дозу согласно рекомендованной схеме вакцинации.

Для теста используйте не менее 8 беременных овцематок, у которых отсутствуют антитела к RVF.

При использовании живой вакцины от овцематок отбирают сыворотки перед вакцинацией, через 7 и 14 дней после вакцинации и непосредственно перед заражением. В случае инактивированной вакцины отбирают сыворотки от ягнят до первой и второй инъекции примовакцинации и во время заражения.

Вакцинируют не менее восьми овцематок согласно рекомендованной схеме. В качестве контролей сохраняют не менее восьми овцематок. В случае живых вакцин каждую овцу надлежащим способом заражают вирулентным RVFV через 20-22 дней. В случае инактивированных вакцин, каждую овцематку заражают через 14 дней после завершения примовакцинации. Овцематок наблюдают ежедневно в течение 14 дней после заражения и проводят мониторинг клинических признаков и вирусной нагрузки путем выделения вируса и проведения количественной ОТ-ПЦР в крови.

Тест считается недействительным, если антитела к RVFV в сыворотке контрольных животных указывают на то, что во время теста наблюдалась интеркуррентная инфекция вирусом.

Вакцина соответствует тесту, если в течение периода наблюдения после заражения наблюдается значительное сокращение продолжительности и титра виремии и заметное снижение клинических признаков (если вирус, использовавшийся для заражения, вызывает такие симптомы) у вакцинированных овец по сравнению с контролями.

2.3.4. Вакцины, разрешающие применение стратегии DIVA (обнаружение инфекции у вакцинированных животных)

В настоящее время стратегия DIVA для существующих вакцин против RVF отсутствует.

2.3.5. Продолжительность иммунитета

В рамках процедуры авторизации производитель должен продемонстрировать продолжительность иммунитета данной вакцины либо посредством контрольного заражения, либо путем использования валидированного альтернативного теста, например, серологического, по окончании заявленного периода действия защиты. Продолжительность иммунитета должна составлять не менее 1 года, при этом вакцина должна вводиться в начале сезона moskitov.

2.3.6. Стабильность

Стабильность всех вакцин должна быть продемонстрирована как часть исследований по определению срока хранения вакцины для авторизации.

Срок действия партии лиофилизированной вакцины против RVF или партии жидкой инактивированной вакцины не должен быть менее 1 года.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- AFETINE J.M., TIJHAAR E., PAWESKA J.T., NEVES L.C., HENDRIKS J., SWANEPOEL R., COETZER J.A., EGBERINK H.F. & RUTTEN V.P. (2007). Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of an N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants. *Vet. Microbiol.*, 31, 29-38.
- Barnard B.J.H. (1979). Rift Valley fever vaccine - antibody and immune response in cattle to a live and an inactivated vaccine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 50, 155-157.
- Barnard B.J.H. & Botha M.J. (1977). An inactivated Rift Valley fever vaccine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 48, 45-48.
- Bird B.H., Khristova M.L., Rollin P.E. & Nichol S.T. (2007). Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J. Virol.*, 81, 2805-2816.
- Botros B., Omar A., Elian K., Mohamed G., Soliman A., Salib A., Salman D., Saad M. & Earhart K. (2006). Adverse response of non-indigenous cattle of European breeds to live attenuated Smithburn Rift Valley fever vaccine. *J. Med. Virol.*, 78, 787-791.
- Cette-Sossah C., Billecocq A., Lancelot R., Defernez C., Favre J., Bouloy M., Martinez D. & Albina E. (2009). Evaluation of a commercial competitive ELISA for the detection of antibodies

- to Rift Valley fever virus in sera of domestic ruminants in France. *Prev. Vet. Med.*, 90, 146-149.
- Coackley W., Pini A. & Gosdin D. (1967). Experimental infection of cattle with pantropic Rift Valley fever virus. *Res. Vet. Sci.*, 8, 399-405.
- Coetzer J.A.W. (1982). The pathology of Rift Valley fever. 11. Lesions occurring in field cases in adult cattle, calves and aborted fetuses. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 49, 11-17.
- Coetzer J.A.W. & Barnard B.J.H. (1977). *Hydrops amnii* in sheep associated with hydranencephaly and arthrogryposis with Wesselsbron disease and Rift Valley fever viruses as ethological agents. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 44, 119-126.
- Digoutte J.P., Jouan A., LeGuenno B., Riou O., Philippe B., Meegan J.M., Ksiazek T.G. & Peters C.J. (1989). Isolation of the Rift Valley fever virus by inoculation into *Aedes pseudoscutellaris* cells: comparison with other diagnostic methods. *Res. Virol.*, 140, 31-41.
- Drosten C., Gottig S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H. & Gunther S. (2002). Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, Dengue virus, and Yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 2323-2330.
- Dungu B., Louw I., Lubisi A., Hunter P., von Teichman B.F. & Bouloy M. (2010). Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley fever clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine*, 28, 4581-4587.
- Easterday B.C. (1965). Rift Valley fever. *Adv. Vet. Sci.*, 10, 65-127.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2012). Version 7.5. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2011). Rift Valley fever vaccine development, progress and constraints. Proceedings of the GF-TADs meeting, Rome, Italy, FAO Animal Production and Health Proceedings, No 12.
- Garcia S., Crance J.M., Billecocq A., Peinnequin A., Jouan A., Bouloy M. & Garin D. (2001). Quantitative realtime PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 4456-4461.
- Gerdes G.H. (2004). Rift Valley fever. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 23(2), 613-623.
- Giorgi C., Accardi L., Nicoletti L., Gro M.C., Takehara K., Hilditch C., Morikawa S. & Bishop D.H. (1991). Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology*, 180 (2), 738-573.
- HUNTER P. & BOULOY M. (2001). Investigation of C13 RVF mutant as a vaccine strain. Proceedings of 5th International sheep veterinary congress, 21-25 January 2001, Stellenbosch, South Africa. University of Pretoria, South Africa.
- Hunter P., Erasmus B.J. & Vorster J.H. (2002). Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 69, 95-98.
- Jacobson R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev.*

sci. tech. Off. int. Epiz., 17, 469-486.

Jansen Van Vuren P., Potgieter A.C., Paweska J.T. & Van Dijk A.A. (2007). Preparation and evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus N protein for the detection of IgG and IgM antibodies in humans and animals by indirect ELISA. *J. Virol. Methods*, 140, 106-114.

Jupp P.G., Grobbelaar A.A., Leman P.A., Kemp A., Dunton R.F., Burkot T.R., Ksiazek T.G. & Swanepoel R. (2000). Experimental detection of Rift Valley fever virus by reverse transcription-polymerase chain reaction assay in large samples of mosquitoes. *J. Med. Entomol.*, 37(3), 467-471.

Linthicum Kenneth J., Davies F.G., Kairo A. & Bailey C.L. (1985). Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus *Phlebovirus*). Isolations from *Diptera* collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J. Hygiene*, 95 (1), 197-209.

Madani T.A., Al-Mazrou Y.Y., Al-Jeffri M.H., Mishkhas A.A., Al-Rabeah A.M., Turkistani A.M., Al-Sayed M.O., Abodahish A.A., Khan A.S., Ksiazek T.G. & Shobokshi O. (2003). Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin. Infect. Dis.*, 37, 1084-1092.

Mansfield K.L., Banyard A.C., McElhinney L., Johnson N., Horton D.L., Hernandez-Triana L.M. & Fooks A.R. (2015). Rift Valley fever virus: a review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe. *Vaccine*, 33 (42), 5520-5531. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.08.020.

McIntosh B.M., Russel D., Dos Santos I. & Gear J.H.S. (1980). Rift Valley fever in humans in South Africa. *S. Afr. Med. J.*, 58, 803-806.

Meadors G.F., Gibbs P.H., & Peters C.J. (1986). Evaluations of a new Rift Valley fever vaccine: Safety and immunogenicity trials. *Vaccine*, 4, 179-184.

Meegan J.M. (1981). Rift Valley fever in Egypt: An overview of the epizootics in 1977 and 1978. *Contrib. Epidemiol. Biostat.*, 3, 100-103.

Meegan J.M. & Bailey C.L. (1989). Rift Valley fever. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. IV, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 52-76.

Morrill J.C., Mebus C.A. & Peters C.J. (1997a). Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 58 (10), 1104-1109.

Morrill J.C., Mebus C.A. & Peters C.J. (1997b). Safety of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in fetal and neonatal bovids. *Am. J. Vet. Res.*, 58 (10), 1110-1114.

Muller R., Saluzzo J.F., Lopez N., Dreier T., Turell M., Smith J. & Bouloy M. (1995). Characterization of clone 13 - a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus which is altered in the small segment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53, 405-411.

Munyua P., Murithi R.M., Wainwright S., Githinji j., Hightower A., Mutonga D., Macharia j., Ithondeka P.M., Musaa J., Breiman R.F., Bloland P. & Njenga M.K. (2010). Rift Valley fever outbreak in livestock in Kenya, 2006-2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83, 58-64.

Nakane P.K. & Akira Kawaoi A. (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of

conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22, 1084-1091.

Paweska J.T., Burt F.J., Anthony F., Smith S.J., Grobbelaar A.A., Croft J.E., Ksiazek T.G. & Swanepoel R. (2003). IgG-sandwich and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in domestic ruminants. *J. Virol. Methods*, 113 (2), 103-112.

Paweska J.T., Mortimer E., Leman P.A. & Swanepoel R. (2005). An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *J. Virol. Methods*, 127, 10-18.

Sall A.A., Thonnon J., Sene O.K., Fall A., Ndiaye M., Baudes B., Mathiot C. & Bouloy M. (2001). Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J. Virol. Methods*, 91, 85-92.

Smithburn K.C. (1949). Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br. J. Exp.*, 30, 1-16.

Swanepoel R. & Coetzer J.A.W. (1994). Rift Valley fever. *In: Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Vol. 1, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, UK.

Swanepoel R., Stuthers J.K., Erasmus M.J., Shepherd S.P., McGillivray G.M., Shepherd A.J., Erasmus B.J. & Barnard B.J.H. (1986). Comparative pathogenicity and antigenic cross-reactivity of Rift Valley fever and other African phleboviruses in sheep. *J. Hyg. (Camb.)*, 97, 331-346.

Van Vuren P.J. & Paweska J.T. (2010). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay-based techniques for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in thermochemically inactivated sheep sera. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10, 697-699.

Weiss K.E. (1957). Rift Valley fever- a review. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 5, 431-458.

Williams R., Ellis C.E., Smith S.J., Potgieter C.A., Wallace D., Mareledwane V.E. & Majiwa P.A. (2011). Validation of an IgM antibody capture ELISA based on a recombinant nucleoprotein for identification of domestic ruminants infected with Rift Valley fever virus. *J. Virol. Methods*, 177 (2), 140-146.

*

* *

Примечание: Имеются справочные лаборатории МЭБ по лихорадке долины Рифт (см. таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или обратитесь на веб-сайт МЭБ с целью ознакомления с самым последним списком: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Пожалуйста, обращайтесь в референтные лаборатории МЭБ за получением дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам в отношении лихорадки долины Рифт