

ГЛАВА 3. 3.10.

ОСПА ПТИЦ

РЕЗЮМЕ

Описание болезни: Оспа птиц - болезнь кур и индеек. Ее вызывает ДНК-содержащий вирус рода *Aviropoxvirus*, семейства *Poxviridae*. Вирус распространен по всему миру, отличается медленным распространением и тем, что приводит к образованию пролиферативных поражений и струпьев на поверхности кожи, дифтерийными поражениями в верхних частях желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей. При кожной форме уровень смертности обычно низкий, и заболевшие птицы с большой долей вероятности выздоровеют в отличие от тех, которые страдают от дифтерийной формы. При дифтерийной форме пролиферативные поражения в носовых ходах, гортани и трахеи могут вызывать респираторный дистресс и смерть от удушья.

Оспа птиц является причиной временного снижения яйценоскости и снижения показателей прироста у молодняка.

Идентификация возбудителя: Подозревать оспу птиц следует в ситуации, когда на участках кожи, подвергшихся воздействию возбудителя болезни, появляется сыпь. С помощью гистологического исследования кожных и дифтерийных поражений обнаруживают гиперплазию эпителия с внутрицитоплазматическими включениями в пораженных клетках. С помощью метода окрашивания по Gimenez в мазках, взятых от поражений, можно обнаружить элементарные тельца вируса. Электронная микроскопия поражений позволяет выявить вирусные частицы с типичными морфологическими характеристиками вируса оспы (в ходе негативного окрашивания или в ультратонких срезах с поражений).

Дифтерийная форма оспы птиц, поражающая трахею, должна быть дифференцирована от инфекционного ларинготрахеита, причиной которого является герпесвирус, и который характеризуется наличием внутриядерных телец-включений.

Выделение вируса проводят с помощью инокуляции в хорион-аллантоисные мембраны 9-12-дневных развивающихся куриных эмбрионов или в клеточные культуры птиц. Для выделения вируса следует использовать яйца от стад, свободных от специфических патогенов.

Серологические тесты: Иммунные ответы на вирус оспы птиц могут быть продемонстрированы с помощью реакции вируснейтрализации, иммунодиффузии в агаровом геле или с помощью реакций пассивной гемагглютинации, твердофазного иммуноферментного анализа или иммуноблоттинга.

Требования к вакцинам: В продаже имеются модифицированные живые вакцины против вируса оспы птиц и оспы голубей, сделанные на основе куриных эмбрионов или клеточной культуры птиц. Использование вакцин показано в тех регионах, где болезнь эндемична, или в хозяйствах, где данную инфекцию уже диагностировали.

ВВЕДЕНИЕ

Морфологические характеристики вируса оспы птиц схожи с морфологическими характеристиками других вирусов семейства *Poxviridae*. Созревший вирус (элементарное тельце) напоминает по форме кирпичик с примерными размерами 330 x 280 x 200 нм. Внешнюю оболочку составляют расположенные в произвольном порядке поверхностные трубочки. Вирион содержит электронно-плотное, двояковогнутое ядро, расположенное по центру, или нуклеотид с двумя латеральными тельцами в каждом вогнутом участке. Вирион окружен оболочкой. Геном вируса оспы птиц, состоящий из 288 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.), кодирует более 250 генов.

Оспа птиц распространена по всему миру. Причиной болезни является ДНК-содержащий вирус рода *Avipoxvirus*, семейства *Poxviridae* (Tripathy, 1993; Tripathy & Reed, 2013). Показатели инцидентности болезни отличаются в зависимости от региона. Это объясняется разными климатическими условиями, разными стратегиями разведения птицы, санитарно-гигиеническими стандартами и применением на практике регулярной вакцинации. Болезнь может стать причиной снижения яйценоскости или отставания молодняка в развитии.

Оспа птиц - медленно распространяющееся вирусное заболевание кур и индеек. Кожная форма болезни, так называемая «сухая оспа», характеризуется появлением пролиферативных поражений, начиная с небольших узелков и заканчивая бородавчатыми наростами сферической формы на кожных покровах гребешка, сережек или иных участков кожи без перьев. При дифтерийной форме («влажная оспа») на слизистых оболочках появляются слегка приподнятые, белые, непрозрачные узелки. Они быстро увеличиваются в размерах, превращаясь в дифтерийные пленки желтоватого цвета. Поражения появляются на слизистых оболочках ротовой полости, пищевода, гортани или трахеи. Показатели смертности при дифтерийной форме выше, чем при кожной форме, среди молодняка смертность может достигать 50%.

В геноме вируса оспы птиц удалось наблюдать интеграцию последовательностей вируса ретикулоэндотелиоза (REV) (Singh et al., 2000; 2003b). Интересно то, что данная инсерция произошла более 50 лет назад (Kim & Tripathy, 2001). В то время как большинство полевых штаммов вируса оспы птиц содержат провирус REV, вакцинные штаммы содержат лишь остатки длинных терминальных повторов (Singh et al., 2003b). Присутствие провируса REV в геноме полевых штаммов вируса оспы птиц усиливает вирулентность. Afonso et al., 2000 определили полную последовательность генома вакцинно-подобного штамма вируса оспы птиц. В настоящее время функции большинства генов остаются неизвестными. Интересен, однако, тот факт, что вирус отличается склонностью персистировать во внешней среде, окружающей домашнюю птицу, в течение длительного времени, хотя другие вирусы могут и не выживать. Защита вируса от агрессивных факторов внешней среды обеспечена наличием в геноме вируса фотолиазного гена и гена телец включения типа А (Srinivasan et al., 2001; Srinivasan & Tripathy, 2005). Среди разных оспенных вирусов птиц наблюдают перекрёстную реактивность антигенов, и многие гены оказываются консервативными. В настоящее время доступна информация о небольшом количестве исследований, проведенных с целью антигенного, генетического и биологического сравнения вируса оспы птиц с другими оспенными вирусами птиц, особенно теми, которые поражают диких птиц. Недавно была представлена полная последовательность генома вируса оспы канареек.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

Таблица 1. Методы тестирования, доступные для диагностики оспы птиц и цели их использования

| Метод | Цель | | | | | |
|--|------------------------------|--|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| | Свобода популяции от болезни | Свобода конкретных животных от болезни до передвижения | Вклад в стратегии искоренения | Подтверждение клинических случаев | Превалентность инфекции - надзор | Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации |
| Идентификация возбудителя¹ | | | | | | |
| Выделение вируса | - | + | - | + | - | - |
| ПЦР в реальном времени | - | + | - | + | - | - |
| Выявление иммунного ответа | | | | | | |
| РИД | - | - | - | - | - | ++ |
| ИФА | - | + | - | - | + | ++ |
| непрямой МФА | - | - | - | + | - | - |

Пояснения: +++ = рекомендованный метод; ++ = подходящий метод; + = можно использовать в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или прочие факторы сильно ограничивают применимость; - = не подходит для этой цели.

Хотя не все эти тесты, отмеченные статусом +++ или ++, прошли официальную валидацию, их особенности и то обстоятельство, что при их повсеместном использовании получают точные результаты, делают эти методы приемлемыми.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РИД – реакция иммунодиффузии в агаровом геле; ИФА - твердофазный иммуноферментный анализ; непрямой МФА = непрямой метод флюоресцирующих антител

1. Идентификация возбудителя

Вирус оспы птиц размножается в цитоплазме клеток эпителия, образуя крупные внутрицитоплазматические включения (тельца Боллингера), которые содержат меньшие по размеру элементарные тельца (тельца Борреля). Включения могут быть продемонстрированы при окрашивании срезов кожных и дифтерийных поражений гематоксилин-эозином (Н&Е), акридиновым оранжевым или красителем Гимза (Tripathy et al., 1973). Элементарные тельца можно выявить в мазках от поражений с помощью метода Gimenez (Tripathy & Hanson, 1976), который описан ниже. Можно использовать электронную микроскопию для демонстрации вирусных частиц, имеющих типичную для вирусов оспы морфологию, с помощью негативного окрашивания или в ультратонких срезах пораженных тканей (Doane & Anderson, 1987).

1.1. Метод мазков для оспы птиц

1.1.1. Процедура тестирования

- i) Поместить каплю дистиллированной воды и образец поражения (дифтерийного или кожного) на чистое предметное стекло. Подготовить

¹ Рекомендуется сочетание методов идентификации возбудителя на одном клиническом образце.

тонкий мазок, раздавив образец поражения другим чистым предметным стеклом и перевернув верхнее стекло несколько раз.

- ii) Высушить на воздухе и аккуратно зафиксировать мазок над пламенем.
- iii) Окрасить мазок в течение 5-10 минут свежеприготовленным первичным красителем (8 мл исходного раствора² основного фуксина, смешанного с 10 мл фосфатного буфера³, pH 7.5, профильтрованного через бумажный фильтр Ватмана №1).
- iv) Тщательно промыть в проточной воде.
- v) Провести контрастное окрашивание малахитовым зеленым (0,8% в дистиллированной воде) в течение 30-60 секунд.
- vi) Промыть мазок в проточной воде и высушить.
- vii) Проверить мазок с помощью масляной иммерсии. Элементарные тельца вируса оказываются красными, примерный размер составляет 0,2-0,3 мкм.

1.2. Выделение вируса

Вирус оспы птиц можно выделить путем введения подозрительного материала в куриные яйца с развивающимися эмбрионами или в культуру клеток от птиц. Примерно 0,1 мл тканевой суспензии кожных или дифтерийных поражений, обработанных антибиотиками в надлежащей концентрации, инокулировать в хорион-аллантаоисные мембраны (САН) 9-12-дневных развивающихся куриных эмбрионов или в клеточные культуры. Рекомендуется проверить инокулят на наличие остаточной контаминации путем инокуляции кровяного агара и агара Макконки в планшет, который необходимо проверить через 24 часа после инкубации. После инокуляции эмбрионов пробой, свободной от контаминации, их инкубируют в течение 5-7 дней при 37°C, затем проверяют на наличие очагов белых оспенных поражений или на наличие генерализованного утолщения САН. Гистопатологическое обследование поражений САН демонстрирует эозинофильные внутрицитоплазматические включения после окрашивания с помощью Н&Е (Tripathy et al., 1973; Tripathy & Reed, 2013).

Первичные культуры фибробластов куриных эмбрионов, клетки почек и кожи куриных эмбрионов, или перевиваемая линия клеток QT-35 перепелок также могут быть использованы для размножения вируса оспы птиц (Ghildyal et al., 1989; Schnitzlein et al., 1988). Адаптация штаммов вируса к клеточным культурам является важным требованием для образования бляшек, поскольку не все штаммы образуют бляшки на начальной стадии.

1.3. Молекулярные методы

Для сравнения полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса оспы птиц можно воспользоваться анализом ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) (Ghildyal et al., 1989; Schnitzlein et al., 1988). Однако этот метод не используется для рутинной диагностики.

Клонированные фрагменты генома вируса оспы птиц могут быть эффективно использованы в качестве зондов нуклеиновой кислоты для диагностики оспы птиц.

² Исходный раствор: Раствор основного фуксина (5 г) в 95% этаноле (100 мл) постепенно вводят во второй раствор кристаллического фенола (10 г) в дистиллированной воде (900 мл). Данный исходный раствор в стеклянной бутылке с плотно завинченной крышкой инкубируют в течение 48 часов при 37°C, затем хранят при комнатной температуре.

³ Фосфатный буфер, pH 7.5: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.47 г) и Na_2HPO_4 (11.65 г) добавляют в дистиллированную воду (1000 мл) и хранят при 4°C.

ДНК вируса, выделенное из поражений, можно выявить путем гибридизации либо с помощью радиоактивно-меченых, либо нерадиоактивно-меченых геномных зондов. Данный метод особенно полезен для дифференциации оспы птиц и инфекционного ларинготрахеита, когда поражения обнаруживают в трахее (Fatunmbi et al., 1995).

Геномные последовательности ДНК различных размеров могут быть амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами (Fallavena et al., 2002; Lee & Lee, 1997). Данная методика может быть полезна только при весьма небольшом количестве вирусной ДНК в образце. Геномная ДНК, выделенная из срезов тканей, зафиксированных в формалине, и полученная от птиц, положительных на наличие вируса оспы птиц, (исходя из наличия цитоплазматических включений), может быть использована для ПЦР-амплификации геномных фрагментов специфического размера.

2. Серологические тесты

Хотя обе разновидности иммунитета (клеточно-опосредованный СМІ и гуморальный) играют важную роль в случаях заражения различными оспенными вирусами, использование теста на СМІ в рутинном режиме не совсем целесообразно. Поэтому для измерения специфического гуморального иммунного ответа можно применить следующие серологические тесты: реакция вируснейтрализации, реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД), реакция пассивной гемагглютинации, метод флуоресцирующих антител, а также твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Подтверждение удачной вакцинации можно получить, проверив стадо в возрасте 7-10 дней после вакцинации на наличие «видимых реакций в месте введения вакцины». К таким реакциям относится отек кожного покрова или струп в месте введения вакцины. Наличие этих признаков является свидетельством удачной иммунизации.

2.1. Реакция вируснейтрализации

После перекрёстного взаимодействия вирус\сыворотка остаточная активность вируса может быть проанализирована в куриных яйцах с развивающимися эмбрионами или в культуре клеток (Morita, 1973). Данный технически сложный тест не удобен для использования в целях рутинной диагностики. Лишь у некоторых отобранных вирусов есть способность к бляшкообразованию в клетках куриных эмбрионов. Нейтрализующие антитела вырабатываются в течение 1-2 недель после заражения.

2.2. Иммунодиффузии в агаровом геле

Преципитирующие антитела можно выявить в реакции тест-сывороток против вирусных антигенов. Антиген можно получить путем разрушения ультразвуком и гомогенизации пораженной кожи и САМ поражений, а также в результате обработки зараженных культур клеток, как описано ниже в Разделе В.2.6. Лизированную суспензию центрифугируют, а появившийся супернатант используют в качестве антигена. Среда для диффузии в геле состоит из 1% агара, 8% хлорида натрия и 0,01% тиомерсола. Антиген вируса помещают в центральную лунку, а тест-сыворотки помещают в боковые лунки. Важно включить сыворотки положительного и отрицательного контроля. Планшеты инкубируют при комнатной температуре. Линии преципитации проявляются через 24-48 часов после инкубации антигена с антителами к гомологичным или близкородственным штаммам.

Тест менее чувствителен, чем ИФА (Buscaglia et al., 1985), или реакция пассивной гемагглютинации (Winterfield & Hitchner, 1965).

2.3. Пассивная гемагглютинация

Таннизированные эритроциты овцы или лошади сенсibiliзируют частично очищенным антигеном вируса оспы птиц (Tripathy et al., 1970). Антиген готовят из зараженных САМ или клеток, как описано ниже в Разделе 2.6. Пассивная гемагглютинация является более чувствительным тестом, чем РИД. Данный тест вызывает перекрестные реакции среди различных видов оспенных вирусов птиц.

2.4. Методы флуоресцирующих антител

Прямые и непрямые методы флуоресцирующих антител позволяют обнаружить внутрицитоплазматическое свечение в зараженных клетках. Обычно используется второй тест и состоит он из двух этапов: антитела против вируса оспы птиц вступают в реакцию с антигеном в зараженных клетках, после чего вступают в реакцию вторичные, меченые флуоресцеин-изотиоцианатом антитела против куриного гамма глобулина (например, козий антикуриный).

Такие меченые антитела имеются в продаже. В этой связи можно эффективно использовать в методах флуоресцирующих антител срезы тканей, зафиксированные в формалине.

2.5. Иммунопероксидаза

Провести специфическое окрашивание цитоплазматических включений получается, когда специфические поликлональные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, против вируса оспы птиц вступают в реакцию с гидратизированными срезами фиксированных тканей, зараженных оспой птиц (САМ и кожа), или с клеточной культурой. Похожие результаты получают при использовании либо поликлональных или моноклональных антител в непрямой реакции. Преимущество данной методики заключается в том, что срезы можно проверить в световом микроскопе и хранить их в течение длительного времени без потери цвета (Tripathy et al., 1973).

2.6. Твердофазный иммуноферментный анализ

Для выявления гуморальных антител к вирусу оспы птиц были разработаны различные варианты ИФА. Они могут выявлять антитела на 7-10 день после заражения (Buscaglia et al., 1985), но пока нет коммерческих наборов для данных реакций.

Антигены вируса оспы птиц приготавливают либо из зараженных QT-35 клеточных монослоев или из САМ поражений. Зараженные QT-35 клетки осаждают центрифугированием (700 g в течение 10 минут при 4°C), промывают в изотоническом растворе (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM этилен-диамин тетрауксусная кислота [EDTA]), поводят лизис в гипотоническом растворе (10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM KCl, 5 mM EDTA), содержащем 0,1 % Тритон X-100 и 0,025% бета-меркаптоэтанол. Клеточный и ядерный дебрис удаляют с помощью низкоскоростного центрифугирования (500 g в течение 5 минут при температуре 4°C), а полученный в результате супернатант используют, как источник антигенов вируса оспы птиц для ИФА и иммуноблоттинга. Для выделения вирусного антигена из САМ поражений требуется первоначальное измельчение поражений с последующей обработкой с детергентами, как описано ранее. Вирус, размноженный в фибробластах куриных эмбрионов и в клетках дермы куриных

эмбрионов, также используется в качестве антигена. Подготовка антигена осуществляется тем же способом, что и для клеток QT-35.

Лунки микротитрационных планшетов сенсибилизируют 1 мкг растворимого антигена вируса оспы птиц в 100 мкл сенсибилизирующего буфера (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) и инкубируют в течение ночи при температуре 4°C (Buscaglia et al., 1985; Tripathy et al., 1973). Каждую лунку затем единожды промывают в промывном растворе (0.29 M NaCl, 0.05% Tween 20) и блокируют в течение 1 часа при 37°C с помощью фосфатного буферного раствора (ФБР, pH 7.4), содержащего 3% альбумин бычьей сыворотки (АБС).

После одного промывания в лунки добавляют серийные разведения тест-сывороток в ФБР, содержащем 1% АБС.

После интенсивного качания в течение 2 часов при 37°C лунки трижды промывают перед тем, как добавить в них 100 мкл лунку конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител, полученных против куриных IgY (H+L), в рекомендованном разведении ФБР. После 2 часов инкубации при 37°C и трех последующих промываний в каждую лунку добавляют 100 мкл субстрата пероксидазы ТМВ³. Реакции останавливают добавлением 1M фосфорной кислоты, а с помощью ИФА-ридера регистрируют абсорбцию при 450 нм.

2.7. Иммуноблоттинг

Антигенные отличия между штаммами вируса оспы птиц можно оценить с помощью иммуноблоттинга или ветерн-блоттинга. При использовании данного метода антигены вируса, сепарированные с помощью электрофореза в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS PAGE), вступают в реакцию либо с поликлональными, либо с моноклональными антителами против вируса оспы птиц (Ghildyal et al., 1989; Singh et al., 2003a; Singh & Tripathy, 2000). Для рутинной диагностики этот метод не достаточно удобен.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

1. Общая информация

Руководства по производству ветеринарных вакцин даны в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, приведённые здесь и в Главе 1.1.8., по сути, являются общими и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями, например, руководствами, представленными в Меморандуме ветеринарных служб № 800.50 Министерства сельского хозяйства США, Службы по инспектированию здоровья животных и растений.

Многие компании, производящие вакцины для домашней птицы, производят, в том числе, и вакцины против оспы птиц и оспы голубей, полученные из куриных эмбрионов или клеточной культуры. Вакцины используют на восприимчивых стадах, где болезнь эндемична, или где она была диагностирована ранее.

Следует учитывать пассивно приобретенный иммунитет у потомства от стад, которые либо недавно подверглись естественному заражению, либо были вакцинированы. Поскольку пассивный иммунитет (в течение 2-3 недель) может помешать размножению вакцинного вируса, то такое потомство необходимо вакцинировать только после снижения уровня приобретенных антител. Вакцину против оспы птиц вводят путем прокалывания перепонки крыла.

2. Общее описание производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристика посевного материала

Необходимо строго соблюдать процедуры, описанные в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин* и в Главе 1.1.9 *Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*.

2.1.1. Биологические характеристики исходного вакцинного вируса

Для профилактики возникновения оспы птиц среди домашней птицы используются живые вирусные вакцины против оспы птиц, произведенные либо на основе вируса оспы птиц, либо на основе вируса оспы голубей. Вирус размножают либо в куриных эмбрионах, свободных от специфических патогенов (СПФ-эмбрионах), либо в культуре клеток от птиц. Необходимо установить исходный вакцинный вирус и использовать его в соответствии с требованиями системы посевных серий. Необходимо четко регистрировать источник, историю пассажей и характеристики.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних веществ)

Размножение исходного вакцинного вируса следует проводить в условиях и с использованием материалов, которые соответствуют установленным стандартам. Его следует проверять на свободу от контаминации, идентичность и чистоту.

2.1.3. Валидация в качестве вакцины

i) Чистота

До проведения тестов на чистоту исходный вакцинный вирус можно нейтрализовать специфической гипериммунной сывороткой. В силу сложностей нейтрализации различных оспенных вирусов птиц допускается проведение центрифугирования исходного вакцинного вируса при 1000 g в течение 20 минут, после которого следует провести фильтрацию через 0,2 мкм фильтр. Затем в тестах используют нейтрализованный или фильтрованный исходный вакцинный вирус, чтобы продемонстрировать свободу от посторонних веществ. Такие тесты следует проводить на яйцах с развивающимися эмбрионами или клеточных культурах птицы, чтобы продемонстрировать отсутствие репликации посторонних вирусов, и на СПФ-цыплятах, чтобы продемонстрировать свободу от антител к посторонним возбудителям.

ii) Безопасность

Вакцины должны быть произведены только из вируса, который представляет собой стабильный аттенуированный штамм или естественно появившийся низковирулентный изолят.

Необходимо продемонстрировать безопасность вакцины, используя рекомендованный способ введения, т.е. прокалывание перепонки крыла, на восприимчивых птицах всех возрастов. Подходящим вариантом тестирования может быть процедура, при которой берут 10 СПФ-

цыпляют и каждому в перепонку крыла вводят иглу, предварительно обмакнув ее в вакцину. За птицами наблюдают в течение 7-10 дней с целью обнаружения признаков «ответной реакции в месте введения препарата» и наличия побочного действия, связанного с применением вакцины. К таким реакциям относится отек кожного покрова или струп в месте введения вакцины. Наличие этих признаков является свидетельством удачной вакцинации. Тест на безопасность следует повторить как минимум через шесть серийных пассажей вируса на СПФ-цыплятах, чтобы подтвердить отсутствие возврата к вирулентности.

iii) Эффективность

Сведения должны быть получены с использованием наивысшего уровня пассажа (пятый пассаж из исходного вакцинного вируса) и самого низкого титра вируса в готовом продукте: 20 СПФ-цыплят, достигших минимального возраста вакцинации, должны получить с помощью рекомендованного метода одну дозу вакцины. Вакцинированные птицы вместе с 20 невакцинированными птицами того же возраста и из того же источника должны пройти процедуру контрольного заражения через 3 недели. Контрольное заражение проводят путем скарификации и нанесения вирулентного штамма вируса оспы птиц. У 90% контрольных птиц должны появиться поражения, вызванные вирусом контрольного заражения, и минимум 90% вакцинированных птиц должны остаться свободными от таких поражений.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Вакцину производят на основе системы посевных серий из валидированного исходного вакцинного штамма. Производство следует осуществлять в специально аккредитованных производственных помещениях, спроектированных таким образом, чтобы не допустить возникновения рисков контаминации. Все среды и культуры клеток необходимо тестировать для подтверждения их свободы от контаминации.

2.2.2. Требования к компонентам

Исходный вакцинный вирус можно размножать на СПФ-куриных эмбрионах, используя САМ или клеточные культуры птиц, такие как первичные культуры фибробластов куриных эмбрионов, клетки почек и кожи куриных эмбрионов.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

Во время валидации вакцины сведения об эффективности необходимо сравнить с объемом вируса в составе вакцины. Таким образом, можно установить подходящую иммуногенность. Вакцина должна быть расфасована по контейнерам готовой лекарственной формы, чтобы гарантировать, что в каждом контейнере содержится достаточно вируса для получения специфической иммуногенности.

2.2.4. Испытание партий готовой продукции

i) Стерильность

Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации описаны в Главе 1.1.9.

ii) Идентичность

Тесты на идентичность должны демонстрировать, что в лаборатории при размножении нескольких штаммов для мультивалентных вакцин нет никаких других вакцинных штаммов.

iii) Безопасность

Для каждой партии вакцины следует использовать тест на безопасность, описанный выше в разделе С.2.1.3., исключая требование о шести пассажах на СПФ-курах.

iv) Иммуногенность

Тесты на содержание вируса следует проводить с использованием каждого из, как минимум, трех контейнеров. Разведения должны перекрывать инфекционный диапазон 0 - 100% с использованием этапов пятикратных разведений и, минимум, семи повторностей на разведение. Тесты следует проводить параллельно со стандартной вакциной, если таковая имеется в наличии. Каждую партию вакцины следует титровать в разбавителе, предназначенном для данной цели. Показатель титра вируса обычно не должен превышать $1/10$ от безопасной дозы вакцины и не должен быть ниже титра высвобождения, определённого в тесте на эффективность. Подходящая иммуногенность для аттенуированной живой вакцины против оспы птиц находится, вероятно, на уровне 10^5 ЭИД₅₀ (эмбрион инфицирующая доза) на мл. Можно воспользоваться альтернативными тестами на иммуногенность в соответствии с национальными нормативными требованиями.

2.3. Требования к выдаче разрешений\регистрации\лицензии на вакцину

Для регистрации вакцины всю необходимую информацию о производстве вакцины и процедуре контроля качества следует подать в соответствующие уполномоченные органы. Данная информация должна быть подготовлена по 3-м последовательно произведенным партиям вакцин, объём которых составляет не менее $1/3$ от обычного производственного объёма партии.

Частью процесса производства является производственный контроль.

2.3.2. Требования к безопасности

В тестах используют однократную дозу, избыточную дозу (только для живых вакцин) и повторную дозу (с учетом максимального количества доз для первичной вакцинации, и, при необходимости первичной ревакцинации\бустерной вакцинации), содержащие максимально допустимое количество антигена и, в зависимости от ситуации, максимальное количество вакцинных штаммов.

2.3.3. Меры предосторожности (опасности)

Обычно не рекомендуется вакцинировать несущихся птиц. Необходимо избегать контакта человека с живой вакциной. Обычная вакцина против оспы птиц не предназначена для голубей, пусть даже их иммунизируют вакциной против оспы голубей. Во многих странах вакцина против оспы голубей была заменена на аттенуированную живую вакцину против оспы птиц, разработанную для суточных цыплят. По причине отсутствия вакцины против оспы голубей эти препараты были безопасно использованы на голубях.

2.3.4. Требования к эффективности

Для регистрации коммерческой вакцины, партия (или партии) продукта, произведенного по стандартным методикам и содержащего минимальное количество антигена или показатель иммуногенности, должна подтвердить свою эффективность (способность вызывать защиту). Каждую будущую коммерческую партию необходимо проверить до выпуска на рынок, чтобы гарантировать тот же показатель иммуногенности, который был получен в ходе тестирования партий, использованных в качестве образца для тестов на эффективность.

Эффективность вакцины (способность вызывать защиту) обычно рассчитывают на вакцинированных животных, непосредственно оценивая их резистентность в ходе контрольного заражения живым патогеном, а именно оценивают отсутствие местного поражения в месте прививания вакцинированных животных и появление поражений у животных контрольной группы.

2.3.4. Продолжительность иммунитета

Тест на эффективность, описанный в разделе С.2.1.3, можно использовать для определения продолжительности иммунитета (приблизительно 6-12 месяцев) путем тестирования после вакцинации с определенными интервалами, используя для каждого теста отдельные группы птиц.

2.3.5. Стабильность

Для обоснования указанных сроков годности препарата необходимо предоставить подтверждение его стабильности. Стабильность подтверждают методами титрования вируса, проводимого с интервалами вплоть до 3 месяцев после истечения заявленного срока годности на минимум 6 партиях вакцины, хранящихся с соблюдением рекомендованных условий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- AFONSO C.L., TULMAN E.R., LU Z., ZSAK L., KUTISH G.F. & ROCK D.L. (2000). The genome of fowlpox virus. *J. Virol.*, 74, 3815–3831.
- BUSCAGLIA C., BANKOWSKI R.A. & MIERS L. (1985). Cell-culture virus-neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity in chickens against fowlpox. *Avian Dis.*, 29, 672–680.
- DOANE F.W. & ANDERSON N. (1987). *Electron Microscopy in Diagnostic Virology: A Practical Guide and Atlas*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- FALLAVENA L.C., CANAL C.W., SALLE C.T., MORAES H.L., ROCHA S.L., PEREIRA R.A. & DA SILVA A.B. (2002). Presence of avipoxvirus DNA in avian dermal squamous cell carcinoma. *Avian Pathol.*, 31, 241–246.
- FATUNMBI O.O., REED W.M., SCHWARTZ D.I. & TRIPATHY D.N. (1995). Dual infection of chickens with pox and infectious laryngotracheitis (ILT) confirmed with specific pox and ILT DNA dot-blot hybridization assays. *Avian Dis.*, 39, 925–930.
- GHILDYAL N., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (1989). Genetic and antigenic differences between fowlpox and quailpox viruses. *Arch. Virol.*, 106, 85–92.
- KIM T.J. & TRIPATHY D.N. (2001). Reticuloendotheliosis virus integration in the fowlpox virus genome: not a recent event. *Avian Dis.*, 45, 663–669.
- LEE L.H. & LEE K.H. (1997). Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J. Virol. Methods*, 63, 113–119.
- MORITA C. (1973). Studies on fowlpox viruses. II. Plaque-neutralization test. *Avian Dis.*, 17, 93–98.
- SCHNITZLEIN W.M., GHILDYAL N. & TRIPATHY D.N. (1988). Genomic and antigenic characterization of avipoxviruses. *Virus Res.*, 10, 65–76.
- SINGH P., KIM T.J. & TRIPATHY D.N. (2000). Re-emerging fowlpox: evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol.*, 29, 449–455
- SINGH P., KIM T.-J. & TRIPATHY D.N. (2003a). Identification and characterisation of fowlpox virus strains using monoclonal antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15, 50–54.
- SINGH P., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (2003b). Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *J. Virol.*, 77, 5855–5862.
- SINGH P. & TRIPATHY D.N. (2000). Characterization of monoclonal antibodies against fowl poxvirus. *Avian Dis.*, 44, 365–371.
- SRINIVASAN V., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (2001). Fowlpox virus encodes a novel DNA repair enzyme, CPD-photolyase, that restores infectivity of UV light-damaged virus. *J. Virol.*, 75, 1681–1688.

SRINIVASAN V. & TRIPATHY D.N. (2005). The DNA repair enzyme, CPD-photolyase restores the infectivity of UVdamaged fowlpox virus isolated from infected scabs of chickens. *Vet. Microbiol.*, 108, 215–223.

TRIPATHY D.N. (1993). Avipoxviruses. In: *Virus Infections of Vertebrates – Virus Infections of Birds*, Vol. 4, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, 5–15.

TRIPATHY D.N. & HANSON L.E. (1976). A smear technique for staining elementary bodies of fowlpox. *Avian Dis.*, 20, 609–610

TRIPATHY D.N., HANSON L.E. & KILLINGER A.H. (1973). Immunoperoxidase technique for detection of fowlpox antigen. *Avian Dis.*, 17, 274–278.

TRIPATHY D.N., HANSON L.E. & MYERS W.L. (1970). Passive hemagglutination test with fowlpox virus. *Avian Dis.*, 14, 29–38.

TRIPATHY D.N. & REED W.M. (2013). Pox. In: *Diseases of Poultry*, 13th edition, Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V. eds. Wiley-Blackwell, USA, pp 333–349.

WINTERFIELD R.W. & HITCHNER S.B. (1965). The response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowlpox viruses. *Avian Dis.*, 9, 237–241.