

ГЛАВА 3.3.14.

БОЛЕЗНЬ НЬЮКАСЛА (ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА)

РЕЗЮМЕ

Болезнь Ньюкасла (БН) вызывают вирулентные штаммы серотипа парамиксовируса птиц типа I (APMV-1) рода Avulavirus, принадлежащего к семейству Paramyxoviridae. Существует 10 серотипов парамиксовирусов птиц, обозначенных с APMV-1 по APMV-10.

Было выявлено, что вирус БН способен заражать более 200 видов птиц, но тяжесть болезни варьируется в зависимости от вида хозяина и штамма вируса. Даже низковирулентные штаммы APMV-1 могут индуцировать тяжелую форму болезни при обостряющем присутствии других организмов или в неблагоприятных условиях окружающей среды. Предпочтительный метод диагностики – выделение вируса и последующая характеристика.

Идентификация возбудителя: Суспензии в растворе антибиотика, приготовленные из трахеальных или ротоглоточных и клоакальных мазков (или фекалий), полученных от живых птиц, или фекалий и образцов органов, полученных от мертвых птиц и объединенных в пулы, вводят в аллантоисную полость 9-11-дневных куриных яиц с развивающимися эмбрионами. Яйца инкубируют при температуре 37°C на протяжении 4-7 дней. Аллантоисную жидкость любого яйца, в котором содержатся мертвые или умирающие эмбрионы, и все яйца в конце периода инкубации тестируют на наличие гемагглютинирующей активности и/или с помощью валидированных молекулярных методов.

Любые гемагглютинирующие агенты необходимо тестировать на наличие специфического ингибирования, используя моноспецифическую антисыворотку к вирусу APMV-1. APMV-1 может демонстрировать степень перекрестного родства с некоторыми другими серотипами парамиксовируса птиц, в частности APMV-3 и APMV-7.

Вирулентность недавно выделенного APMV-1 можно оценить с помощью интрацеребрального индекса патогенности (ICPI). Вирулентность можно также оценить с помощью молекулярных методов: полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и секвенирования. В большинстве стран вирус БН подлежит официальному контролю, и существует высокий риск распространения вируса из лаборатории; следовательно, необходимо поддерживать должный уровень биобезопасности и биоазащиты, а также проводить оценку риска, чтобы, в случае необходимости, определить его уровень.

Серологические тесты: Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) наиболее широко используется в серологическом исследовании БН. Польза этой реакции в диагностике зависит от вакцинального иммунного статуса тестируемых птиц и от преобладающих условий болезни.

Требования к вакцинам: Для вакцинации домашней птицы используются живые вирусы низкой вирулентности (лентогенные) и умеренной вирулентности (мезогенные), в

зависимости от ситуации по болезни и национальных требований. Также используют инактивированные вакцины.

Живые вакцины можно вводить домашней птице разными способами. Вакцину обычно получают из инфекционной аллантоисной/ амниотической жидкостей, собранных из инокулированных яиц птиц с развивающимися эмбрионами; некоторые из них готовят из инфекционных культур клеток. Готовый продукт должен быть получен при экспансии исходного и рабочего посевных вирусов.

Инактивированные вакцины вводят внутримышечно или подкожно. Их обычно получают при добавлении формальдегида к инфекционным вирусным препаратам, или при обработке бетапропиолактоном. Большинство инактивированных вакцин готовят путем эмульгирования с минеральным или растительным маслом.

Недавно разработали и лицензировали рекомбинантные вакцины против болезни Ньюкасла, которые используют вирусные векторы, такие как герпес-вирус индеек или вирус оспы птиц, в которых экспрессирован HN-ген, F-ген или оба этих гена.

Если вирулентные формы вируса БН используются для производства вакцины или в исследованиях с использованием контрольного заражения, учреждение должно соответствовать требованиям МЭБ к предприятиям, работающим с патогенами группы 4, что эквивалентно уровню биобезопасности 3 (BSL3-AG или BSL3-E), согласно классификации Департамента сельского хозяйства Соединенных Штатов Америки. В некоторых странах может потребоваться дополнительный регулирующий надзор.

А. ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Ньюкасла (БН) вызывают специфические вирусы типа парамиксовирусов птиц серотипа I (APMV-I), принадлежащих к роду *Avulavirus* подсемейству *Paramyxovirinae*, семейству *Paramyxoviridae*. С помощью серологических исследований и филогенетического анализа выделенные от птиц парамиксовирусы классифицировали на десять серотипов от APMV-1 до APMV-10 (Miller *et al.*, 2010a); вирус болезни Ньюкасла (БНВ) обозначили как APMV-1 (Alexander & Senne, 2008b).

С тех пор как болезнь Ньюкасла распознали в 1926 году, во многих странах она является эндемичной. Во многих странах, за исключением некоторых, производящих домашнюю птицу для широкой продажи, практикуется профилактическая вакцинация.

Одним из наиболее характерных свойств различных штаммов вируса БН является варьирование их патогенности для цыплят. Штаммы ВБН были сгруппированы в 5 патотипов на основе клинических признаков, наблюдаемых у инфицированных цыплят (Alexander & Seonne, 2008b). Этими патотипами являются:

1. Висцеротропный везикулярный: высокопатогенная форма, при которой часто наблюдаются геморрагические поражения кишечника;
2. Нейротропный везикулярный: форма, вызывающая высокий уровень смертности, обычно, после респираторных или нервных признаков;
3. Мезотропный: форма, представленная респираторными признаками, иногда нервными признаками, но уровень смертности низок;

4. Lentогенный или респираторный: форма, представленная слабой или субклинической респираторной инфекцией;

5. Бессимптомный: форма, состоящая в субклинической кишечной инфекции.

Группы патотипов редко бывают четко обозначены (Alexander & Allan, 1974), значительные совпадения могут наблюдаться даже в случаях инфекций СПФ птиц. Кроме того, обострение клинических признаков, вызванных менее серьезными штаммами, случается при переносе инфекции другими организмами или при наличии неблагоприятных окружающих условий. Поскольку признаки клинической болезни у цыплят широко различаются, и диагностика может в дальнейшем быть осложнена разными ответами на инфекцию разными хозяевами, клинические признаки, взятые отдельно, не являются надежной основой для диагностики БН. Однако характерные признаки и поражения, связанные с вирулентными патотипами дают веские основания для подозрений присутствия болезни.

ВБН является патогеном человека, и наиболее типичным признаком инфекции у человека является конъюнктивит, который развивается в течение 24 часов после попадания вируса ВБН в галаза (Swayne & King, 2003). Инфекции, о которых сообщалось, не угрожали жизни человека и обычно не длились дольше, чем день или два (Chang, 1981). Наиболее очевидные признаки заболевания у людей – глазные инфекции, которые обычно включают одностороннее или двустороннее покраснение, обильное слезовыделение, отек века, конъюнктивит и субконъюнктивное кровоизлияние. Несмотря на то, что влияние на глаза достаточно сильное, инфекция носит обычно временный характер и не затрагивает роговицу. Доказательств передачи болезни от человека к человеку нет. Существует одно сообщение о выделении АPMV-1, похожего на голубиный, из ткани легких, мочи и фекалий больного с ослабленным иммунитетом, который умер от пневмонии (Goebel *et al.*, 2007).

БН, как указано в Разделе В. 1.6 данной главы, подлежит официальному надзору в большинстве стран, и существует большой риск распространения вируса из лаборатории; таким образом, необходимо проводить оценку риска, чтобы установить уровень биологической безопасности и защиты, необходимой для диагностики и характеристики вируса. Предприятие должно соответствовать требованиям к соответствующим Группам патогенности, которые определяются в ходе оценки рисков, как указано в Главе 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита в ветеринарных микробиологических лабораториях и вивариях*. В пределах предприятия работа должна осуществляться на уровне биобезопасности 2 или выше. Страны, в которых нет специализированных национальных или региональных лабораторий, должны отправлять образцы в справочную лабораторию МЭБ.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация возбудителя

1.2. Образцы для выделения вируса

В случае, когда исследования БН являются результатом тяжелой болезни или высокого уровня смертности в стадах домашней птицы, обычно вирус выделяют у недавно умерших птиц или больных птиц, умерщвленных гуманным способом. Образцы, взятые от мертвых птиц должны представлять собой орально-назальные смывы, а также пробы, взятые из

тканей легких, почек, кишечника (включая содержимое кишечника), скопления лимфоидной ткани в расширенной части стенки слепой кишки, селезенки, мозга, печени и сердца. Образцы могут быть отобраны отдельно или объединены в пулы, хотя пробы кишечника и головного мозга обычно обрабатывают отдельно от других проб.

Пробы от живых птиц должны включать как трахеальные или ротоглоточные, так и клоакальные смывы, клоакальные смывы должны быть заметно покрыты фекальным материалом. Небольшим птицам с хрупким телосложением можно нанести вред при взятии сынов, адекватной альтернативой могут служить собранные свежие фекалии.

В случае, когда возможности получения образцов ограничены, важно тестировать клоакальные мазки (или фекалии) и трахеальные (или ротоглоточные) смывы или трахеальные ткани, а также органы и ткани, которые серьезно поражены или связаны с клинической болезнью. Образцы необходимо брать на ранних стадиях болезни.

Образцы необходимо помещать в изотонический фосфатно-буферный солевой раствор (ФБР), рН 7,0-7,4, содержащий антибиотики. Среды на основе белка, например, сердечно-мозговая вытяжка или ТРИС-буферный триптозный бульон, также используются, поскольку они обеспечивают дополнительную стабильность вирусу, особенно во время транспортировки. Антибиотики можно менять в зависимости от местных условий, это могут быть, например, пенициллин (2000 ед./мл), стрептомицин (2 мг/мл), гентамицин (50 мкг/мл) и микостатин (1000 ед./мл) для тканей и трахеальных мазков, но для фекалий и клоакальных мазков их концентрации должны быть в пять раз выше. Важно повторно довести концентрированный стоковый раствор до рН 7,0-7,4 перед добавлением в образец. Если необходим контроль *Chlamydophila*, следует включить 0,05-0,1 мг/мл окситетрациклина. Фекалии и измельченные ткани должны быть приготовлены в виде 10-20% (в/о) суспензий в растворе антибиотика. Суспензии необходимо обрабатывать сразу после инкубирования в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Когда немедленную обработку провести невозможно, образцы можно хранить при температуре 4°C до 4 дней.

Выделение вируса (предписанный тест для международной торговли)

Супернатантные жидкости фекалий или суспензии тканей и мазки, полученные при осветлении в процессе центрифугирования при 1000 *g*, в течение 10 минут при температуре, не превышающей 25°C, вводят в объемах 0,2 мл в аллантаисную полость каждого из, по меньшей мере, пяти СПФ яиц на 9-11 день инкубации. Если отсутствуют СПФ-яйца, необходимы яйца, как минимум, отрицательные по антителам к ВБН. После инокуляции эти яйца инкубируют при температуре 35-37°C в течение 4-7 дней. Чтобы ускорить конечное выделение можно провести два пассажа с интервалом в 3 дня, получая при этом результаты, сопоставимые с двумя пассажами с интервалом 4-7 дней (Alexander & Senne, 2008a). Яйца, содержащие мертвых или умирающих эмбрионов, и все яйца, оставшиеся к концу периода инкубирования, сначала необходимо охладить до температуры 4°C в течение 4 часов или в течение ночи, затем аллантаисные жидкости необходимо проверить в отношении гемегглютинирующей (НА) активности. Жидкости, которые дают отрицательную реакцию, необходимо пассировать, как минимум, еще на одной партии яиц. Стандартные проверки на контаминацию должны проводиться посредством посева штрихом в чашке с агаром Лурии. Считывание результатов следует проводить через 24 и 48 часов инкубирования против источника света. Контаминированные образцы можно обработать инкубированием с повышенной

концентрацией антибиотиков в течение 2-4 часов (растворы гентамицина, пенициллина G и амфотерицина B в конечной концентрации максимум 1 мг/мл, 10000 ед/мл, и 20 мкг/мл, соответственно). Образцы, сильно контаминированные бактериями, которые нельзя удалить с помощью центрифугирования или антибиотиков, можно профильтровать с помощью стерильных фильтров, 0,45 и 0,2 мкм. К фильтрации стоит прибегать только в том случае, когда другие методы оказываются неэффективными, поскольку агрегация может значительно снизить титр вируса.

Суспензии гомогенизированных органов, фекалий или мазков, подготовленные как для выделения в яйцах, могут также применяться для выделения в культуре клеток. Штаммы APMV-1 могут реплицироваться в большинстве культур клеток птичьего и не птичьего происхождения, среди которых наиболее широко используются: клетки печени куриных эмбрионов (CEL), клетки почек куриных эмбрионов (CEK), фибробласты куриных эмбрионов (CEF), клетки почек африканской зеленой мартышки (Vero), миогенные (QM5) и связанные с куриными эмбрионами (CER) клетки (Terregino & Capua, 2009). Первичные культуры клеток птичьего происхождения являются наиболее чувствительными. Чтобы оптимизировать вероятность восстановления низковирулентных изолятов, в культурную среду необходимо добавить трипсин. Концентрация трипсина будет зависеть от типа трипсина и типа используемой культуры. Например, можно добавить 0,5 мкг/мл свиного трипсина в фибробласты куриных эмбрионов. Рост вируса обычно сопровождается цитопатогическим действием, которое, как правило, проявляется в разрушении монослоя и формировании синцитии.

Оптимальная культуральная система для вируса в некоторой степени зависит от штамма. Некоторые штаммы APMV-1 растут плохо в культуре клеток и реплицируются до более высоких титров в эмбрионах, в то время, как некоторые штаммы PMV-1 голубя (PPMV-1) и APMV-1, такие как апатогенный штамм Ulster, можно выделить в клетках печени или почек цыплят, но не в эмбрионах (Kouwenhoven, 1993). Если возможно, особенно при работе с образцами, подозреваемыми в инфекции PPMV-1, выделение вируса необходимо проводить с использованием обоих субстратов (эмбрионов и первичных клеток куриных эмбрионов). Поскольку титр вируса в культуре клеток обычно очень низкий, дополнительные этапы репликации в эмбрионах необходимо проводить до описания изолята методом РТГА или другими фенотипическими методами.

1.3. Идентификация вируса

ГА активность, обнаруженная в бактериологически стерильных жидкостях, полученных из инокулированных яиц может быть результатом присутствия любого из 10 подтипов APMV (включая ВБН) или 16 подтипов гемагглютининов вирусов гриппа А или восьми других серотипов парамиксовируса. Нестерильная жидкость может содержать бактериальную ГА. Присутствие ВБН можно подтвердить при использовании специфической антисыворотки в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Обычно используется антисыворотка цыплят, приготовленная против одного из штаммов ВБН.

В РТГА может наблюдаться перекрестная реактивность между различными серотипами парамиксовируса. Перекрестная реактивность может наблюдаться между вирусами APMV-1 и APMV-3 (особенно это касается APMV-3, ассоциированного с попугаями, обычно выделяемого от домашних или экзотических птиц) или APMV-7. Риск неправильного типирования изолята можно значительно сократить, используя набор

референтных сывороток или моноклональных антител (МАт), специфических для АPMV-1, АPMV-3 АPMV-7.

В настоящее время методики для обнаружения и типирования РНК АPMV-1 в аллантоисной жидкости инокулированных яиц птиц, основанные на ОТ-ПЦР, используются в диагностических лабораториях все чаще. Тем не менее, стоит брать во внимание генетическую вариабельность изолятов АPMV-1, поскольку она может привести к ложным отрицательным результатам лабораторных тестов, базирующихся на генетике. Смотрите Разделы В.1.5; В.1.8 и В.1.9 настоящей главы.

1.4. Индекс патогенности

Чрезвычайная вариабельность вирулентности различных изолятов ВБН и широко распространенное использование живых вакцин означает, что идентификация изолята как АPMV-1 у птиц, проявляющих клинические признаки, не подтверждает диагноз БН, поэтому также требуется оценка вирулентности изолята (см. Раздел В.1.6). Раньше использовали такие тесты как определение среднего времени гибели эмбрионов, определение внутривенной патогенности и вариации этих тестов (Alexander & Senne, 2008b), но согласно международному соглашению окончательная оценка вирулентности вируса основывается на исследовании интрацеребральной патогенности (ICPI). Настоящее определение МЭБ (Раздел В.1.6) также признает достижения в понимании молекулярной основы патогенности и позволяет подтверждать вирулентность вируса, но не отсутствие вирулентности, с помощью *in vitro* тестов, которые определяют последовательность аминокислот в сайте расщепления белка F0. Из-за сложности процедуры, ICPI следует определять, только когда есть серьезная необходимость, основанная на эпизоотических обстоятельствах, например, при первом выделении изолята во время вспышки. Нецелесообразно определять ICPI изолятов, обнаруженных в ходе стандартного надзора за здоровыми птицами.

In vitro тесты на штаммы, выделенные у видов, отличных от кур (голубей или горлиц, например) могут привести к некоторым проблемам и могут не дать точной интерпретации результатов до проведения пассажа на цыплятах или куриных эмбрионах (Alexander & Parsons, 1986.) Более точный признак реальной патогенности вирусов болезни Ньюкасла для восприимчивых видов можно получить в ходе экспериментальной инфекции статистически значимого количества (≥ 10) молодых или взрослых птиц стандартной дозой вируса (например, 10^5 EID₅₀) естественным путем (например, перорально-назальным способом).

1.4.1. Индекс интрацеребральной патогенности (ICPI)

- i) Свежую, инфицированную аллантоисную жидкость с титром НА $>2^4$ ($>1/16$) разбавляют в 1/10 стерильного изотонического раствора без добавлений, таких как антибиотики.
- ii) 0, 05 мл разбавленного вируса вводят интрацеребрально каждому из десяти цыплят, выведенным из СПФ стада. Во время инокуляции возраст цыпленка должен составлять от 24 до 40 часов.
- iii) В течение 8 дней птиц проверяют каждые 24 часа
- iv) При каждой проверке птицам присваивают баллы: 0 – если нормальная, 1 – если больная, 2 – если умерла. (Живых, но неспособных есть и пить, птиц, необходимо умертвить гуманным способом и считать их мертвыми при следующем наблюдении.

Мертвым особям присваивается 2 балла во время каждого оставшегося ежедневного наблюдения после смерти.)

v) Индекс интрацеребральной патогенности – это средний балл, присвоенный птице за каждое наблюдение в течение 8 дней.

У наиболее вирулентных вирусов индекс будет приближаться к 2.0, в то время как индекс низковирулентных или бессимптомных кишечных штаммов будет близок к 0.0.

1.5. Молекулярная основа патогенности

Во время репликации, происходит продуцирование частиц вируса APMV-1 с участием гликопротеина-предшественника, F0, который необходимо расщеплять на F1 и F2, для того, чтобы частицы вируса стали инфекционными. Это пост-трансляционное расщепление опосредовано протеазами клетки хозяина. Трипсин способен расщеплять F0 для всех штаммов ВБН.

По видимому, F0 молекулы вирусов, вирулентных для цыплят, могут быть расщеплены протеазой хозяина или протеазами, выявляемыми в широком диапазоне клеток и тканей, и, таким образом, могут распространяться в организме хозяина, поражая жизненно важные органы, но F0 молекулы вирусов низкой вирулентности могут расщепляться только определенными протеазами хозяина, что приводит к тому, что эти вирусы растут только в определенных типах клетки хозяина.

Большинство вирусов APMV-1, которые являются патогенными для цыплят, имеют последовательность $^{112}\text{R/K-R-Q-K/R-R}^{116}$ (Choi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008a) в С-конце белка F2 и F (фенилаланин) в остатке 117, N-конец белка F1, в то время как вирусы низкой вирулентности имеют последовательности в том же участке $^{112}\text{G/E-K/R-Q-G/E-R}^{116}$ и L (лейцин) в остатке 117. Некоторые изученные варианты вирусы голубей (PPMV-1) имеют последовательность $^{112}\text{G-R-Q-K-R-F}^{117}$, но дают высокие показатели ICPI (Meulemans *et al.*, 2002). Таким образом, необходимым представляется наличие, по меньшей мере, одной пары основных аминокислот в остатках 116 и 115 плюс фенилаланин в остатке 117 и основной аминокислоты (R) в остатке 113, чтобы вирус был вирулентным для цыплят. Однако у некоторых PPMV-1 могут быть вирулентные сайты расщепления с низкими показателями ICPI (Collins *et al.*, 1994). Данный феномен связан не с белком слияния (Dotmans *et al.*, 2009), а с комплексом репликации, состоящим из нуклеопротеина, фосфопротеина и полимеразы (Dormans *et al.*, 2010).

Было проведено несколько исследований с использованием молекулярных методов с целью определения последовательности сайта расщепления F0 с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), либо в выделенном вирусе, либо в тканях и фекалиях, взятых от инфицированных птиц, с последующим анализом продукта при помощи проведения рестрикционного анализа, гибридизации с использованием зонда или нуклеотидного секвенирования для того, чтобы установить стандартный тест *in vitro* на вирулентность (Miller *et al.*, 2010b). Определение последовательности расщепления F0 может дать четкое представление о вирулентности вируса, и это было включено в дефиницию БН (см. Раздел В.1.6.).

При диагностике БН важно понимать, что выявление присутствия вируса с многочисленными основными аминокислотами у сайта расщепления F0 подтверждает присутствие вирулентного или потенциально вирулентного вируса, но невозможность обнаружить вирус или обнаружение ВБН без многочисленных основных аминокислот у

сайта расщепления F0 при использовании молекулярных методов не подтверждает отсутствие вирулентного вируса. Несоответствие праймера, или возможность смешанной популяции вирулентных и авирулентных вирусов означает, что потребуется выделение вируса и оценка вирулентности *in vivo*, например, ICPI.

Анализы вирусов, выделенных в Ирландии в 1990 г. и во время вспышек БН в Австралии с 1998 года, дают убедительные доказательства того, что вирулентные вирусы могут происходить от вирусов-предшественников низкой вирулентности (Alexander & Senne, 2008b). Вирулентный ВБН экспериментально генерирован из вируса низкой вирулентности методом поведения пассажиров на цыплятах (Shengqing *et al.*, 2002).

1.6. Определение болезни Ньюкасла

Вероятно, многие птицы восприимчивы к заражению вирусом APMV-1, как низкой, так и высокой вирулентности для цыплят, хотя клинические признаки, наблюдаемые у инфицированных птиц, сильно варьируются и зависят от таких факторов, как: вирус, вид хозяина, возраст хозяина, заражение другими организмами, стресс, вызванный условиями окружающей среды, и иммунный статус. При некоторых обстоятельствах результатом заражения чрезвычайно вирулентными вирусами может стать внезапно высокая смертность при наличии сравнительно небольшого количества клинических признаков. Таким образом, клинические признаки варьируются, и на них оказывают влияние другие факторы, так что ни один из них не может считаться патогномичным.

Круг клинических признаков даже в отношении восприимчивых хозяев не очень широк. Обычно, вариация заключается в кластерах на двух концах в тестах ICPI, но, по многим причинам, некоторые вирусы могут показывать промежуточную вирулентность. Широкая вариабельность вирулентности и клинических признаков означает, что необходимо точно определять компоненты БН для целей торговли, мер и стратегий контроля. Определение БН, которым пользуются в настоящее время все государства-члены Европейского Союза, указано в Директиве 92/66/ЕЕС Комиссии Европейского Союза.

Определение МЭБ при сообщении о вспышке БН следующее:

«Болезнь Ньюкасла – это инфекция птиц, которую вызывает вирус серотипа 1 парамиксовируса птиц (APMV-1), который соответствует одному из следующих критериев вирулентности:

*a) Вирус имеет индекс интрацеребральной патогенности (ICPI) у однодневных цыплят (*Gallus gallus*) 0,7 или выше.*

или

b) Многочисленные основные аминокислоты были выявлены в вирусе (или прямым способом, или дедукцией) в С-конце белка F2 и фенилаланина в остатке 117, который является N-концом белка F1. Понятие «многочисленные основные аминокислоты» относится, по крайней мере, к трем остаткам аргинина или лизина между остатками 113 и 116. Неудачные попытки выявить характерный паттерн аминокислотных остатков, как описано выше, могут потребовать характеристики выделенного вируса при проведении ICPI теста».

В этом определении аминокислотные остатки пронумерованы, начиная с N-конца аминокислотной последовательности, выведенной из нуклеотидной последовательности F0 гена, 113-116 соответствует остаткам от –4 до –1 из сайта расщепления».

1.7. Моноклональные антитела

Для проведения РТГА были использованы моноклональные антитела мышей (МАт), направленные против штаммов ВБН, для быстрой идентификации ВБН без возможных перекрестных реакций с другими серотипами АPMV, которые могут возникнуть с поликлональными сыворотками. Многие МАт были продуцированы таким образом, чтобы приводить к реакциям в РТГА, которые являются специфичными для определенных штаммов варианта изолятов ВБН (Alexander *et al.*, 1997).

Панели МАт использовались с целью установления антигенных профилей изолятов ВБН на основании того, реагируют они с вирусами или нет. Типичные модели реактивности штаммов РPMV-1 на моноклональные антитела можно использовать для того, чтобы отличать их от других АPMV-1.

1.8. Филогенетические исследования

Разработка усовершенствованных методов для нуклеотидного секвенирования, доступность данных о различных вирусах АPMV-1 в компьютерных базах данных и выявление того, что даже относительно короткая длина последовательности может дать ценные результаты при проведении филогенетических анализов – все это в последние годы привело к значительному продвижению в этих исследованиях. Обнаружено значительное генетическое разнообразие, но вирусы с одинаковыми временными, географическими, антигенными или эпидемиологическими параметрами, делятся на несколько линий или клад, что является ценным свойством при оценке, как глобальной эпизоотологии, так и локального распространения ВБН (Aldous *et al.*, 2003; Cattoli *et al.*, 2010; Czegledi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007).

Несмотря на то, что ранее филогенетические исследования не могли применяться в качестве стандартных методов, доступность и повышенная скорость получения результатов благодаря использованию точных, имеющихся в продаже наборов для проведения ОТ-ПЦР и автоматических секвенаторов в настоящее время означает, что такие исследования доступны сейчас все большему количеству диагностических лабораторий, и дают важные результаты, являющиеся скорее современными, чем ретроспективными (Miller *et al.*, 2010b). Aldous *et al.* (2003) предложили сделать генотипирование изолятов ВБН частью диагностической характеристики вируса для справочных лабораторий путем продуцирования 375-нуклеотидной последовательности F-гена, куда входит сайт расщепления F0, стандартной для всех вирусов, и путем сравнения полученных последовательностей с другими недавними изолятами и 18 вирусами из признанных линий и сублиний. Такой анализ позволит быстро провести эпизоотологическую оценку причин и распространения вирусов, которые вызывают вспышки болезни Ньюкасла.

1.9. Молекулярные методы при диагностике

Кроме использования ОТ-ПЦР и других подобных методов для определения вирулентности ВБН (см. Раздел В.1.5) или для филогенетического исследования (см. Раздел В.1.8) участилось использование молекулярных методов с целью обнаружения ВБН в клинических образцах, преимущество которых состоит в чрезвычайно быстром выявлении присутствия вируса. Необходимо осторожно выбирать образцы для тестирования, потому что некоторые исследования недостаточно чувствительные для обнаружения вируса в некоторых органах, в особенности, в фекалиях (Creelan *et al.*, 2002; Nanthakumar *et al.*, 2000). Обычно в качестве образцов выбирают трахеальные и

ротоглоточные смывы, поскольку их легко обрабатывать, и они содержат малое количество органической примеси, которая может препятствовать извлечению РНК и амплификации с помощью ПЦР. Однако с некоторым успехом использовались образцы тканей, органов и даже фекалий. Система, используемая для выделения РНК, также влияет на успех ОТ-ПЦР на клинических образцах, поэтому для анализа образцов нужно осторожно выбирать наиболее подходящие или валидированные коммерческие наборы.

Обычно системы ОТ-ПЦР используются для амплификации специфической части генома, которая даст дополнительную ценность; например, с помощью амплификации части F-гена, который содержит сайт расщепления F0, продукт можно использовать для оценки вирулентности (Creelan *et al.*, 2002). Возможно, самой серьезной проблемой при использовании ОТ-ПЦР в диагностике является необходимость в пост-амплификационном процессинге из-за высокой вероятности заражения лаборатории и перекрестного заражения образцов. Для предотвращения подобных случаев необходимо строго соблюдать меры предосторожности и нормативные требования к работе с образцами (см. Главу 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических анализов для инфекционных болезней*).

Одним из способов избежать пост-амплификационный процессинг – прибегать к методам ОТ-ПЦР в реальном времени. Преимущества таких исследований заключаются в том, что ОТ-ПЦР в реальном времени основана на использовании флуорогенного зонда для гидролиза или флуоресцентных красителей, что исключает этап пост-амплификационного процессинга и позволяет получить результат менее чем за 3 часа. В настоящее время наиболее широко ОТ-ПЦР в реальном времени применялась для обнаружения АPMV-1 в Соединенных Штатах Америки (США) во время вспышек 2002-2003 гг., когда провели исследование, описанное Wise *et al.* (2004). Праймеры и зонды в данном отчете валидировали на лентогенных, мезогенных и велогенных штаммах, циркулировавших в США. На пике вспышки от 1000 до 1500 образцов ежедневно тестировали с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Однако протоколы не обнаруживают все штаммы вируса болезни Ньюкасла, поэтому особое внимание следует уделять более консервированным частям генома или идти по пути множественного тестирования (т.е. как минимум два независимых лабораторных тестирования для обнаружения антигена) для выявления индекса.

Фактически, одна важная проблема заключается в том, что изоляты АPMV-1 генетически отличаются. Например, одна группа вирусов, которую Aldous *et al.* (2003) отнес к генотипу 6, а Czegledi *et al.* (2006) в последствие поместил к Классу I, настолько сильно отличается от других изолятов вируса АPMV-1, т.е. вирусов Класса II (Czegledi *et al.* 2006), что для их обнаружения с помощью ОТ-ПЦР нужны разные праймеры. Более того, недавно было доказано, что и в случае с вирусами АPMV-1 в пределах Класса II, ген матрикса, в сущности, не является высококонсервированным, и ложноотрицательные результаты возникали в случае расследования вспышки или стандартного надзора за домашней птицей с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени, валидированной USDA и нацеленной на этот ген (Cattoli *et al.*, 2009; 2010; Khan *et al.*, 2010). Кроме того, основанная на гене матрикса ОТ-ПЦР в реальном времени, которая обычно используется для идентификации АPMV-1 не различает между лентогенным и мезогенным/велогенным штаммами, таким образом, ее необходимо использовать в качестве скрининга на наличие РНК АPMV-1в образцах, а не для обнаружения или подтверждения вспышек БН. В особенности это касается районов или стран, которые обычно используют живые вакцины

в отношении домашней птицы. Универсальная, специфичная для белка слияния ОТ-ПЦР в реальном времени используется для обнаружения и патотипирования вируса на вирулентность и может быть полезной, поскольку позволяет быстро провести патотипирование. Однако из-за вариабельности кодирующей сайт расщепления области, доступные тесты ограничены в применении и могут не обнаружить варианты. Перспективный подход, при котором в одну ОТ-ПЦР в реальном времени включали вирусы класса I, использовал Kim *et al.* 2008, который объединил праймеры Класса I и Класса II (Kim *et al.*, 2008b). В настоящее время следует отметить, что мультиплексные ОТ-ПЦР или ОТ-ПЦР в реальном времени направлены на обнаружение расширенного круга вирусов, что часто приводит к снижению чувствительности теста, по сравнению с анализами, где цель одна (Fuller *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

2. Серологические тесты

ВБН можно использовать в качестве антигена во многих серологических тестах, что делает возможным использование реакций нейтрализации или иммуноферментного анализа для оценки уровня антител у птиц. В настоящее время наиболее широкое применение для обнаружения антител к вирусу АPMV-1 у птиц имеет реакция торможения гемагглютинации (РТГА), также используются коммерческие наборы для ИФА, чтобы оценить пост-вакцинные уровни антител. В целом, нейтрализация вируса или титры РТГА и титры, полученные в ходе ИФА, коррелируют на уровне стада, а не на уровне каждой птицы в отдельности. Серологические исследования также используются в диагностических лабораториях, чтобы оценить реакцию антител на вакцинацию, но они имеют ограниченную ценность при надзоре и диагностике БН, из-за практически универсального использования вакцин для домашней птицы.

2.1. Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации

При проведении РТГА, сыворотки цыплят редко дают неспецифические положительные реакции, поэтому нет необходимости предварительно обрабатывать сыворотки. Сыворотки, взятые от других видов птиц (кроме цыплят), могут иногда вызывать агглютинацию эритроцитов цыплят, поэтому в первую очередь необходимо определить это свойство, затем удалить путем адсорбции сыворотки эритроцитами цыплят. Этого можно достичь, добавив 0,025 мл упакованных эритроцитов цыплят в каждые 0,5 мл антисыворотки, легко встряхнув и затем оставив антисыворотку как минимум на 30 минут; эритроциты осаждают посредством центрифугирования при 800 g в течение 2 – 5 минут, и адсорбированные сыворотки отбраковывают.

Разные лаборатории используют вариации при проведении реакций РГА и РТГА. В следующих рекомендованных примерах используют пластиковые микропланшеты с лунками, имеющими V-образную форму дна, в которых конечный объем для обоих типов тестов составляет 0,075 мл. Реактивы, необходимые для проведения этих тестов – изотонический ФБР (0,01 М), рН 7,0-7,2, и эритроциты, полученные, как минимум, от трех СПФ-цыплят и объединенные в пулы с равным объемом раствора Олсвера. (Если СПФ-цыплята отсутствуют, можно взять кровь невакцинированных птиц, которых регулярно проверяют, и в отношении которых было установлено, что они свободны от антител к ВБН). Клетки необходимо промыть три раза в ФБР перед использованием в качестве 1% суспензии (упакованные клетки о/о). В каждом тесте необходимо соответствующим

образом использовать положительные и отрицательные контрольные антигены и антисыворотки.

2.1.1. Реакция гемагглютинации

- i) Распределить по 0,025 мл ФБР в каждую лунку пластикового титрационного микропланшета с лунками, имеющими V-образное дно.
- ii) Поместить 0,025 мл вирусной суспензии (т.е. инфекционной или инактивированной аллантоисной жидкости) в первую лунку. Для точного определения содержания ГА, это необходимо делать из узкого диапазона начальных серий разведений, т.е. 1/3, 1/5, 1/7, и т.д.
- iii) На планшете сделать двукратные разведения 0,025 мл объемов вирусной суспензии.
- iv) Поместить следующие 0,025 мл ФБР в каждую лунку.
- v) Поместить 0,025 мл 1% (o/o) эритроцитов цыплят в каждую лунку.
- vi) Легким постукиванием по планшету перемешать содержимое планшета. Подождать 40 минут, чтобы дать эритроцитам осесть при комнатной температуре, т.е. около 20°C, или 60 минут при температуре 4°C, если температура окружающей среды высокая. К этому времени контрольные эритроциты должны осесть, образуя четко различимую бляшку.
- vii) ГА определяют, опрокидывая планшет и наблюдая за присутствием или отсутствием слезообразного потока эритроцитов. Результаты титрации необходимо считывать до наивысшего разведения, дающего полную гемагглютинацию (отсутствие потока); она представляет 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ) и может быть точно подсчитана, исходя из начального диапазона разведений.

2.1.2. Реакция торможения гемагглютинации

- i) Добавить по 0,025 мл ФБР в каждую лунку пластикового титрационного микропланшета с лунками, имеющими V-образную форму дна.
- ii) Поместить 0,025 мл сыворотки в первую лунку планшета.
- iii) Провести двукратные разведения 0,025 мл объемов сыворотки на планшете.
- iv) Добавить 4 ГАЕ вируса/антигена в 0,025 мл в каждую лунку и оставить минимум на 30 минут при комнатной температуре (т.е. около 20°C) или на 60 минут при температуре 4°C.
- v) Добавить 0,025 мл 1% (o/o) эритроцитов цыплят в каждую лунку, немного встряхнуть и оставить на 40 минут при комнатной температуре, т.е. при 20°C, чтобы эритроциты осели, или на 60 минут при температуре 4°C, если температура окружающей среды высокая. Контрольные эритроциты должны осесть, образуя отчетливую бляшку.
- vi) Титр РТГА – самое высокое разведение сыворотки, приводящее к полному торможению 4 ГАЕ антигена. Агглютинацию оценивают при встряхивании планшетов. Считается, что торможение происходит только в тех лунках, в которых поток эритроцитов на том же уровне, что и в контрольных лунках (положительная сыворотка, вирус/антиген и контроли ФБР).
- vii) Валидность результатов необходимо оценивать против отрицательной контрольной сыворотки, которая не должна дать титр $> 1/4$ ($>2^2$ или $>\log_2 2$ при выражении в виде обратной величины), и положительной контрольной сыворотки, для которой титр должен быть в рамках одного разведения известного титра.

Ценность серологии для диагностики отчетливо связана с ожидаемым иммунным статусом пораженных птиц. Титры РТГА могут рассматриваться как положительные, если наблюдается торможение в разведении сыворотки 1/16 (2^4 или $\log_2 4$ при выражении в виде обратной величины) или больше против 4 ГАЕ антигена. Некоторые лаборатории предпочитают использовать 8 ГАЕ в РТГА. Поскольку это допустимо, это влияет на интерпретацию результатов, так, что положительный титр может составлять 1/8 (2^3 или $\log_2 3$) или выше. Обратная титрация антигена должна быть включена во все тесты для того, чтобы проверить количество использованных ГАЕ.

В вакцинированных стадах, в которых проводится серологический мониторинг, можно идентифицировать вторичные иммунные ответы как результаты контрольного заражения полевым вирусом (Alexander & Allan, 1974), но нужно быть осторожным, поскольку вариации могут быть вызваны другими причинами. Например, было выявлено, что вирусные инфекции АPMV-3 индеек, вакцинированных ВБН, в результате приведут к значительному увеличению титра антител к ВБН (Alexander *et al.*, 1983).

2.2. Твердофазный иммуносорбентный анализ

Доступно множество коммерческих наборов для ИФА, и выбор основывается на нескольких разных методах обнаружения антител к ВБН, включая непрямой, сэндвич и блокирующий или конкурентный ИФА с использованием МАт. Как минимум в одном наборе используется субъединичный антиген. Обычно такие тесты оценивают и валидируют производители, поэтому важно, чтобы инструкции по их эксплуатации четко соблюдались. РТГА и ИФА могут определять уровень антител к разным антигенам; в зависимости от используемой системы ИФА может обнаруживать антитела более чем к одному антигену, в то время, как РТГА, скорее всего, способен обнаруживать антитела только к белку HN. Тем не менее, сравнительные исследования показали, что ИФА воспроизводимы и имеют высокую чувствительность и специфичность; они хорошо коррелируют с РТГА (Brown *et al.*, 1990). У традиционного ИФА есть недостаток, который заключается в том, что анализ необходимо валидировать для каждого вида птиц, в отношении которого он проводится. Для конкурентного ИФА обычно применяют моноклональные антитела, которые, в виду своей специфичности для единичного эпитопа, могут не распознать все штаммы АPMV-1.

С. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ВАКЦИНАМ

1. Предпосылки

1.1 Аргументированное и предусмотренное применение продукта

Детальное описание всех аспектов, касающихся вакцин против ВБН, включая их производство и использование, было опубликовано (Allan *et al.*, 1978), и к нему следует обращаться при уточнении всех деталей процедур, описанных здесь. Руководства по производству ветеринарных вакцин даны в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, данные здесь и в Главе 1.1.8. считаются общими по своей сути, и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями. Если при производстве вакцин или проведении контрольного заражения используются вирулентные формы ВБН, предприятие должно соответствовать требованиям МЭБ для патогенов 4 уровня безопасности, как описано в Главе 1.1.4.

В этом разделе будут рассмотрены традиционные живые и инактивированные вакцины, поскольку они используются повсеместно. Однако следует помнить, что в последнее время была проведена работа по применению методов молекулярной биологии при производстве новых вакцин, и сообщалось об успешных результатах получения защитного иммунитета в отношении вируса оспы птиц, вируса коровьей оспы, вируса оспы голубей, гипервируса индеек и клеток птиц, в которых экспрессированы ген HN, F-ген или оба этих гена ВБН. Некоторые из этих рекомбинантных вирусов были зарегистрированы для использования в определенных странах.

Штаммы ВБН, используемые в коммерческих живых вирусных вакцинах, делятся на две группы: лентогенные вакцины, такие, как Hitchner-B₁, La Sota, V4, NDW, I2, и мезогенные вакцины, например, Roakin, Mukteswar и Komarov. Штаммы из обеих групп отбирали и клонировали, чтобы соблюсти разнообразные определенные критерии для их производства и применения. Все вирусы мезогенных вакцин имеют две пары основных аминокислот у сайта разрезания F0 и показатели ICPI около 1,4. Это означает, что инфекции птиц этими вирусами попадают в намеченную дефиницию БН (Раздел В.1.6), но поскольку эти вакцины, в основном, используются в странах, где болезнь Ньюкасла является эндемичной, это не препятствует их использованию. В США 9CFR 121.3b.818 установлено, что штаммы ВБН с ICPI равным или превышающим 0,7, являются вирулентными и подлежащими регистрации, а изоляты ВБН низкой вирулентности следует использовать для изготовления вакцины. Европейский Союз в Решении Комиссии 93/152/ЕЕС (Европейская комиссия, 1993) утверждает, что для стандартных программ вакцинации против БН вирусы, используемые для приготовления живых ВБН вакцин, должны проходить тестирование в специальных условиях, и их ICPI должен быть ниже 0,4 или 0,5 в зависимости от вводимой дозы вакцины. В 2000 году Комиссия по биологическим стандартам МЭБ также заявила, что ICPI используемых вакцин должен быть <0,7. Однако для того чтобы рассчитать вариабельность между исследованиями и лабораториями необходим небольшой запас, поэтому ICPI посевного вирусного материала вакцины не должен превышать 0,4.

Живые вирусные вакцины можно вводить птицам посредством добавления в питьевую воду, распыления крупными каплями (аэрозоль) или инстилляцией интраназально или на конъюнктиву. Живая вакцина, включающая ВБН низкой вирулентности, для использования *in ovo* зарегистрировали в США. Некоторые мезогенные штаммы вводят внутрь кожи в перепонку крыла. Созданы вакцины для получения оптимальных результатов при введении их специальными способами.

Инактивированные вакцины значительно дороже живых вакцин, и их использование предполагает обработку и введение отдельным птицам. Вакцины готовят из аллантоисной жидкости, инфекционность которой была инактивированна посредством добавления формальдегида или бетапропиолактона. Все это смешивается с минеральным или растительным маслом до получения эмульсии, и вводится внутримышечно или подкожно. Таким образом, каждая птица получает стандартную дозу. При этом не наблюдается ни последующего распространения вируса, ни побочных респираторных реакций. Несмотря на то, что как вирулентные, так и авирулентные штаммы используются в качестве посевных вирусов, с точки зрения контроля безопасности, наиболее подходящим представляется использование авирулентных штаммов. Поскольку после введения размножение вируса не происходит, для иммунизации требуется гораздо большее количество антигенов, чем для вакцинации живым вирусом.

Продолжительность иммунитета зависит от выбранной программы вакцинации. Одним из наиболее существенных факторов, которые оказывают влияние на выбор программы вакцинации – это уровень материнского иммунитета у молодых цыплят, который может варьировать на разных фермах, в разных партиях, и у отдельных цыплят. По этой причине, применяют одну из нескольких стратегий. Либо птиц не вакцинируют до возраста 2-4 недель, когда большинство из них восприимчивы, либо суточных цыплят вакцинируют посредством инстилляций на конъюнктиву или распылением. Это приводит к активному укоренению инфекции у некоторых птиц, которая будет сохраняться до тех пор, пока не ослабеет материнский иммунитет. Через 2-4 недели проводится повторная вакцинация. Вакцинация полностью восприимчивых суточных цыплят, даже самыми слабыми из живых вакцин, может привести к респираторным болезням, особенно в том случае, если присутствует большое количество широко распространенных патогенных бактерий.

Ревакцинацию необходимо проводить с достаточно частыми интервалами с целью поддержания адекватного иммунитета. При осуществлении программ вакцинации часто применяются немного более патогенные живые вирусные вакцины, повышающие иммунитет, а не те вакцины, которые использовались изначально. Эти более патогенные живые вакцины также могут быть использованы после первичной вакцинации инактивированными масляными эмульсионными вакцинами. Несушки с высокими серологическими титрами ВБН защищены от снижения яйценоскости и от снижения качества яиц (яйца без скорлупы, яйца с мягкой скорлупой, обесцвеченные яйца) (Allan *et al.*, 1978; Stone *et al.*, 1975). Уровень гомологии между штаммом вакцины и полевым вирусом может повлиять на степень защиты от снижения производства яиц (Cho *et al.*, 2008).

При разработке программы вакцинации необходимо уделять особое внимание типу используемой вакцины, иммунному статусу и статусу по болезни птиц, которых необходимо вакцинировать, и уровню защиты, требуемому в связи с любой возможностью инфицирования полевым вирусом в местных условиях (Allan *et al.*, 1978). Здесь перечислены два примера программ вакцинации, которые могут быть использованы при разных зооанитарных условиях. В отношении первого примера, в случае, когда болезнь проявляется в спорадической и слабой форме, предлагается установить следующий порядок вакцинации: введение живой вакцины Hitchner-V₁ на конъюнктиву или посредством распыления суточным цыплятам; введение живых вакцин Hitchner – V₁ или La Sota в возрасте 18-21 дней с питьевой водой; введение живой вакцины La Sota с питьевой водой в возрасте 10 недель и инактивированной масляной эмульсионной вакцины в начале периода яйцекладки. Для второго примера, при тяжелой форме болезни и ее широком распространении, применяется тот же протокол до 21 дня, затем следует ревакцинация в возрасте 35-42 дней живой вакциной La Sota, вводимой с питьевой водой, или в виде аэрозоля; в возрасте 10 недель птицам повторно вводят инактивированную вакцину (или мезогенную живую вакцину), эту процедуру повторяют в начале периода яйцекладки (Allan *et al.*, 1978). Первый протокол применим к странам, где вирулентный ВБН не является эндемичным, и предназначен для снижения потерь производства благодаря использованию более слабой вакцины в период первичной вакцинации. Принимая во внимание возможные ограничения по вакцинации против БН, особенно в отношении живых вакцин, необходимо валидировать иммунизацию вакцинированного стада с помощью серологического тестирования. Независимо от применяемой системы

тестирования, т.е. ИФА или РТГА, гуморальный иммунный ответ должен быть продемонстрирован на уровне стада.

Когда для оценки иммунного ответа после вакцинации используют РТГА, необходимо иметь в виду, что титры РТГА сильно зависят от качества вакцины, способе и методе введения, факторов окружающей среды и индивидуальных факторов, а также от вида птицы (например, обычно РТГА ответ некоторых видов, таких как индейки или голуби, ниже, чем ответ кур). Также рекомендуется инактивировать неспецифических гемагглютинирующих возбудителей, которые часто присутствуют в сыворотке некоторых видов птицы, таких как дичь (фазан, куропатка и т.д.), перепелки, страусы и цесарки, путем термической обработки на водяной бане при температуре 56°C в течение 30 минут.

Единичная вакцинация живым лентогенным вирусом может продуцировать ответ у восприимчивых птиц на уровне 4-6 log₂, а титры РТГА 11 log₂ и выше можно получить, следуя программе вакцинации, которая включает масляно-эмульсионную вакцину. Фактические полученные титры и их отношение к защите и продолжительности иммунитета стада и программе сложно предсказать. Вариации титров РТГА могут возникнуть из-за неспецифических факторов, например, из-за антигенных корреляций инфекция другими АМРВ (например, АМРВ-3) может привести к значительному увеличению титров к ВБН. Титр РТГА также зависит от характеристик используемого антигена. Например, использование гомологичного антигена La Sota в РТГА после вакцинации вирусом привело к значительному увеличению титров, по сравнению с гетерологичным вирусом Ulster (Maas *et al.*, 1998). Более того, референтные антигены, продуцированные историческими штаммами, могут снизить чувствительность реакции РТГА, которая используется для обнаружения антител против вирусов БН, циркулирующих в настоящее время. По этой причине важно расследовать антигенное родство между используемым в лаборатории антигеном и циркулирующими в настоящее время вирусами, и между вакцинными штаммами и референтными антигенами ГА, чтобы избежать ошибки при оценке титров антител сыворотки.

2. План производства и минимальные требования для стандартных вакцин

2.1. Характеристика посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Первый принцип, который необходимо учитывать, при выборе штамма для живой вирусной вакцины против БН – тот факт, будет ли она использована как первичная или вторичная вакцина, при этом большое значение имеет ее патогенность. Методы применения и частота использования также являются важными факторами, которые нужно учитывать. В целом, более иммуногенные живые вакцины являются более вирулентными, и таким образом, существует большая вероятность возникновения побочных эффектов. Например, вакцинация штаммом La Sota вызывает больше проблем у молодых восприимчивых птиц, чем штамм Hitcher-B₁, вакцины, основанные на Ulster или специфические клоны La Sota, хотя в целом, обычная вакцина La Sota индуцирует более сильный иммунный ответ. Существует заметная вариация в антигенности различных циркулирующих штаммов, которая может указывать на необходимость адаптировать вакцины более тщательно, чтобы связать их антигенно с любым преобладающим полевым вирусом (Miller *et al.*, 2007).

Живые вакцины, использующие один из двух авирулентных австралийских штаммов вируса болезни Ньюкасла для обеспечения теплоустойчивости, V-4 или I-2, использовали с кормом для животных, чтобы бороться со специфическими проблемами, связанными с разведением кур в развивающихся странах, с переменным успехом. Смысл заключается в том, что такой вакциной можно легко покрыть корм для выгульных кур, и она более устойчива к инаktivации высокой температурой окружающей среды. Недавно для продуцирования достаточных РТГА титров антител и, в некоторых случаях, для предотвращения смертности после контрольного заражения (Wambura, 2011) были сформулированы вакцины, включающие оба вирусных штамма. (Olabode *et al.*, 2010).

Самый важный фактор при выборе посевного материала для приготовления инаktivированной вакцины – это количество продуцируемых антигенов при выращивании в яйцах с развивающимися эмбрионами; в редких случаях стоимость концентрации вируса оправдана. В качестве инаktivированных вакцин использовались как вирулентные, так и лентогенные штаммы, но использование вирулентных штаммов представляет собой ненужный риск, поскольку имеют место манипуляции с большими количествами вирулентного вируса, а также существует опасность неадекватной инаktivации и возможность последующей контаминации. Титр некоторых лентогенных штаммов в яйцах может быть очень высоким.

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

После приготовления посевной материал необходимо проверять на стерильность, безопасность, иммуногенность и наличие посторонних возбудителей. Посевной материал должен быть свободен от контаминации бактериями (включая сальмонеллы), грибами и микоплазмами, а также от посторонних вирусов. Кроме лабораторных исследований на обнаружение лимфоидного лейкоза птиц, цитопатических и гемадсорбирующих возбудителей, инфекционной анемии цыплят и ретикулёза посевной материал, используемый в живых вакцинах, необходимо оценивать на патогены путем инокуляции в куриные эмбрионы и здоровым курам, которых не вакцинировали против болезни Ньюкасла.

2.2. Метод производства

2.2.1 Процедура

Предприятие по производству вакцин должно работать с соблюдением соответствующих процедур и практик биобезопасности. Если БН, как определено в Разделе В.1.6 настоящей главы, используется для производства вакцин или для изучения контрольного заражения, та часть здания, где проводятся данные работы, должна соответствовать требованиям для группы патогенов 4, как это указано в главе 1.1.4 данного *Руководства по наземным животным*.

Сначала готовят посевной материал, а из него рабочий. Если штамм клонировали через предельное разведение или выбором бляшек, приготовление исходной культуры может включать только продуцирование большого объема инфекционной аллантоисной жидкости (минимум 100 мл), которую можно хранить в виде лиофилизированных аликвот (0,5 мл). Посевной вирус неизвестного происхождения необходимо пассировать на СПФ яйцах и клонировать до производства посевного материала. Может также понадобиться несколько пассажей на СПФ цыплятах (Allan *et al.*, 1978).

Для производства вакцин сначала устанавливают рабочий посевной материал, из которого производят серии вакцин, путем увеличения объема аликвоты посевного материала до необходимого объема, чтобы его хватило на производство вакцин в течение 12-18 месяцев. Лучше всего хранить рабочий посевной материал в жидкой форме при температуре -60°C или ниже, поскольку лиофилизированный вирус не всегда размножается до высоких титров при последовательном первом пассаже (Allan *et al.*, 1978)

Большинство вакцин против БН производят в яйцах птиц с развивающимися эмбрионами; живые вирусные вакцины следует продуцировать в СПФ-яйцах. Основным методом производства вакцины является широкомасштабное асептическое размножение вируса; все процедуры проводятся в стерильных условиях. Обычно рабочий посевной вирус разводят в стерильном ФБР, рН 7,2, с последующей инокуляцией 10^3 - 10^4 EID₅₀/0,1-0,2 мл в аллантоисную полость 9-10-дневных СПФ куриных яиц с развивающимися эмбрионами. Затем яйца инкубируют при температуре 37°C . Яйца, содержащие эмбрионы, погибшие в течение 24 часов, должны быть отбракованы. Время инкубации зависит от используемого штамма вируса, и будет predetermined с целью обеспечения максимального урожая при минимальном количестве гибели эмбрионов.

Инфицированные яйца необходимо охладить при температуре 4°C перед сбором урожая. Верхнюю часть яиц удаляют, отсасывают аллантоисную жидкость после угнетения эмбрионов. Следует избегать включения материала желтка и альбумина. До объединения в большие пулы для лиофилизации или инактивации, необходимо сразу поместить жидкость в температуру 4°C и проверить на бактериальную контаминацию. Живые вакцины обычно лиофилизируют. Методология зависит от используемого оборудования и от компетентности производителей, но это является очень важным шагом, так как неадекватные результаты лиофилизации приводят к потере титра и снижению срока годности.

В производстве инактивированных вакцин собранную аллантоисную жидкость обрабатывают либо формальдегидом (обычно конечная концентрация составляет 1/1000) или бетапропиолактоном (типичная конечная концентрация составляет 1/2000-1/4000). Требуемое время должно быть достаточным, чтобы гарантировать свободу от живого вируса. Большинство инактивированных вакцин – неконцентрированные; инактивированную аллантоисную жидкость обычно эмульгируют с минеральным или растительным маслом. Точный состав обычно является коммерческой тайной.

Обычно, инактивированные масляные вакцины готовят как первичные эмульсии воды в масле. Масляная фаза обычно состоит из 9 объемов высоко очищенного минерального масла, такого, как Marcol 52, Drakeol 6VR и BayoIF, и одного объема эмульгирующего агента, например, Arlacel A, Montanide 80 и Montanide 888. Водная фаза – это инактивированный вирус, к которому был добавлен неионный эмульгатор, например, Tween 80. Соотношение масляной и водной фаз обычно 1:1-1:4. Производители прилагают усилия, чтобы достичь баланса между эффектом адьюванта, вязкостью и стабильностью. Если вязкость слишком высокая, вакцину трудно вводить, при пониженной вязкости вакцина является нестабильной.

2.2.2 Требования к субстратам и средам

Большинство живых вирус-вакцин выращивают в аллантоисной полости яиц с развивающимися эмбрионами, но некоторые, особенно некоторые мезогенные штаммы,

адаптировали к разнообразным системам культур ткани. В США и живые, и аттенуированные вакцины против БН готовят в СПФ яйцах.

2.2.3 Контроль в ходе производства

Для вакцин, производимых в яйцах, самым важным контролем процесса является тестирование на контаминацию бактериальной и грибковой микрофлорой. Это является необходимым из-за вероятного присутствия гниющих яиц, что может остаться незамеченным во время сбора урожая. В США проведение пассажей требуется, только если результаты неубедительны.

2.2.4 Контроль конечной серии вакцины

i) Стерильность/чистота

Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно найти в Главе 1.1.9. В США проводится несколько тестов на чистоту для каждой серии живой вакцины. Большинство из этих тестов можно не проводить по отношению к аттенуированным вакцинам, если инактивирующий агент показывает, что результаты тестирования бессмысленны.

ii) Безопасность

Некоторые страны также требуют проведения изучения обратного пассажа для живых вакцин против БН, чтобы убедиться в том, что патогенность не растет, циркулируя среди птиц (Кодекс федеральных правил [CFR], 2009).

iii) Иммуногенность серии

Каждую серию живых вирусных вакцин необходимо тестировать на вариабельность и иммуногенность. Что касается инактивированных вакцин, эффективность процесса инактивации необходимо проверять на яйцах с развивающимися куриными эмбрионами. Каждый из 25 аликвот (0,2 мл) из каждой серии подвергают тройному пассажу на СФП эмбрионах (Allan *et al.*, 1978).

В большинстве стран опубликованы спецификации для контроля производства и тестирования вирус-вакцин против БН, в которые включено определение обязательных проверок вакцин в процессе производства и после него. В Европе Европейская фармакопея указывает, что необязательно проводить тест на иммуногенность на каждой серии вакцины, если было показано, что репрезентативная серия конечного продукта из посевного материала прошла тест на иммуногенность.

В США каждая серия инактивированной вакцины против БН тестируется на иммуногенность путем контрольного заражения вакциной (CFR, 2009). Необходимо использовать как минимум десять вакцинированных, и десять контрольных птиц в возрасте 2-6 недель. Как минимум 90% контрольных птиц должны продемонстрировать типичные признаки болезни Ньюкасла либо погибнуть, и как минимум 90% вакцинированных птиц должны оставаться в нормальном состоянии в течение 14 дней после контрольного заражения. В США титр вируса каждой серии и подсерии живой вакцины против БН должен быть, как минимум, на $10^{0.7}$ EID₅₀ выше, чем титр вируса, используемый при изучении иммуногенности, описанном выше (CFR, 2009). Минимальный титр не должен быть ниже $10^{5.5}$ EID₅₀.

Инфекционная активность вакцин из живого вируса тестируется титрованием вируса в яйцах птиц с развивающимися эмбрионами, чтобы вычислить EID₅₀. Необходимо

десятикратное разведение вируса; ,01 мл каждого разведения вводят в 5 яиц с 9-10-дневными развивающимися эмбрионами. Через 5-7 дней инкубации при температуре 37°C яйца охлаждают и тестируют на наличие гемагглютинирующей активности, которая указывает на наличие живого вируса. Конечная точка EID₅₀ вычисляется с помощью стандартной формулы, такой как формула Спермана-Кербера или Рида-Мюнха (Thayer & Beard, 2008).

2.3. Требования к авторизации

2.3.1 Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Живые вирус-вакцины против БН могут представлять опасность для человека. Были зафиксированы случаи заражения человека вирусами БН как вирулентными, так и низковирулентными для цыплят. При этом после прямого попадания в глаза вирус вызвал острую форму конъюнктивита. Инфекции, как правило, носят временный характер и не затрагивают роговицу.

Минеральные масляные эмульсионные вакцины представляют собой серьезную опасность для людей, которые проводят вакцинацию. При случайной инъекции человека немедленно необходимо сделать разрез и промыть участок, как, например, в случае травмы, полученной при применении шприца для густой смазки.

ii) Возврат аттенуированных/живых вакцин к вирулентности

Согласно 9 CFR 113.329.768 для тестирования вирус-вакцин против БН используется 25 СПФ птиц в возрасте пяти дней и меньше. Десять доз живой вакцины вводят субконъюнктивально каждой птице и наблюдают за ними в течение 21 дня. Ни одна птица не должна продемонстрировать серьезных клинических признаков, и ни одна не должна погибнуть по причинам, связанным с применением вакцины. В качестве альтернативы, можно использовать описанную ниже часть теста на иммуногенность, которую используют до контрольного заражения, в качестве теста на безопасность. В случае возникновения нежелательных реакций в связи с использованием продукта, тест считается неубедительным, и тест на безопасность повторяют. Если при повторе результаты по-прежнему неудовлетворительны – серия вакцины считается некачественной (CFR, 2009). В США тест на безопасность проводят путем введения единичной дозы вакцины 2-6-недельным цыплятам (CFR, 2009); часть теста до контрольного заражения может служить тестом на безопасность.

В виду того, что вирулентный ВБН может возникнуть путем мутации из низковирулентного вируса (Gould *et al.*, 2001,) введение абсолютно новых штаммов БН в живые вакцины должно происходить очень осторожно, и вакцины нужно обязательно оценивать перед использованием. На рекомбинантные штаммы, используемые в живых вакцинах в США, накладываются дополнительные требования по безопасности. Генетическую стабильность вируса необходимо показать на самом высоком пассажном уровне, который будет использоваться при производстве. Необходимо тщательно оценивать фенотипический эффект любой генетической модификации(-ий), чтобы убедиться в том, что генетические модификации не привели к неожиданным результатам *in vivo*. Исследования необходимо проводить на цыплятах, чтобы оценить возможные изменения в тропизме тканей, а также оценить, выделен ли вакцинный вирус. Рекомбинантные штаммы, выделенные в окружающую среду необходимо оценить на

безопасность в отношении нецелевых видов птиц и млекопитающих, а также способность этих видов противостоять данным штаммам в полевых условиях.

iii) Экологические факторы

Отсутствуют.

2.3.2 Требования к эффективности

i) Для животноводства

Для тестирования вирус-вакцин против БН на иммуногенность было предложено несколько методов. Подчеркнута важность использования для оценки подходящего штамма для контрольного заражения (Allan *et al.*, 1978). Штаммы для контрольного заражения, используемые в Европе и США – Herts 33 или GB Texas, соответственно. Для живых вакцин рекомендуемый метод предполагает вакцинацию 10 или более СПФ цыплят или других полностью восприимчивых птиц, в некоторых странах установленное количество птиц – 20, которых вакцинируют в минимальном рекомендуемом возрасте предложенным способом и используя минимальную рекомендуемую дозу. Через 14-28 дней каждую вакцинированную птицу и 10 контрольных птиц подвергают контрольному заражению контрольным вирусом БН посредством введения внутримышечно 10^4 EID₅₀ (50% инфекционной дозы) или 10^5 LD₅₀ (50% летальной дозы). Контрольно зараженных птиц наблюдают в течение 14 дней; как минимум у 90% контрольных птиц должны проявиться клинические признаки, и они должны погибнуть в течение 6 дней от болезни Ньюкасла. Если как минимум 90-95% вакцинированных птиц не будут свободными от клинических признаков – посевной материал считается некачественным.

Для инактивированных вакцин используют 21-28-дневных СПФ или восприимчивых цыплят. В трех группах из 20 цыплят, внутримышечно вводят объемы вакцины, эквивалентные 1/25, 1/50 и 1/100 дозы. Группа из 10 цыплят является контрольной. Спустя 17-21 день проводится контрольное заражение всех птиц посредством инъекции 10^6 LD₅₀ контрольного вируса БН внутримышечно. За цыплятами наблюдают в течение 21 дня. PD₅₀ (50% защитной дозы) подсчитывают, используя стандартные статистические методы. Тест считается валидным только в том случае, когда контрольные птицы после контрольного заражения умирают в течение 6 дней. Вакцина соответствует требованиям теста, если PD₅₀ составляет не менее 50 на каждую дозу, и если более низкий предел достоверности составляет не менее 35 PD₅₀ на дозу. Некоторые надзорные органы принимают тест только при 1/50 в целях обеспечения благополучия животных. Нет необходимости повторно проводить тест на иммуногенность для каждой серии, если было доказано, что репрезентативная серия готового продукта из основного посевного материала прошла тест.

Рекомендуемый тест на эффективность для инактивированных вакцин проводится в США в форме изучения контрольного заражения вакциной (CFR, 2009). Как минимум десять СПФ цыплят в возрасте 2-6 недель вакцинируют минимальной рекомендуемой дозой. Согласно 9CFR 113.205.727 спустя 14 дней после вакцинации вакцинированных птиц и не менее десяти невакцинированных контрольных птиц заражают штаммом GB Texas БН и наблюдают в течение 14 дней. Как минимум у 90% контрольных птиц не должно проявиться никаких клинических признаков БН в период наблюдения. Если как минимум 90% вакцинированных птиц демонстрируют клинические признаки, посевной материал считается некачественным.

ii) Для борьбы и искоренения

Уровень достигнутого иммунитета при вакцинации любой однократной дозой или при любом режиме вакцинации против БН будет значительно варьироваться в зависимости от вакцины и от видов хозяина. Уровень требуемого иммунитета данного хозяина (например, для защиты от гибели, от болезни, потерь мяса и от снижения производства яиц) очень сложно оценить. Обычно, необходимо произвести оценку продолжительности сохранения сывороточных антител, и схемы вакцинации необходимо адаптировать с целью сохранения антител выше принятого уровня (Allan *et al.*, 1978). Большинство коммерческих вакцин были разработаны для борьбы с клиническими признаками, однако они не предотвращают репликацию вируса и не подходят для искоренения.

Передачу ВБН в регионе можно прервать, только если очень высокий процент постоянно проживающей восприимчивой популяции (>85%) иммунизирован в достаточной степени, и их Ab титр составляет $\geq 1:8$ (Boven *et al.*, 2008).

2.3.3. Стабильность

При хранении в рекомендованных условиях готовая вакцина должна сохранять свою иммуногенность, по меньшей мере, в течение срока годности. Ускоренные тесты по определению стабильности, такие, как снижение инфекционности после инкубирования при температуре 37°C в течение 7 дней (Lensing, 1974) можно использовать в качестве руководства в отношении характеристики серии живой вакцины при хранении. Масляные эмульсионные вакцины тоже необходимо подвергать ускоренному старению путем хранения при температуре 37°C в течение не менее 1 месяца, без разделения водной и масляной фаз. США требуют тестирования в реальном времени как минимум трех последовательных партий вирус-вакцины против БН на стабильность (CFR, 2009). Каждую серию оценивают множество раз до даты истечения срока годности, чтобы разработать профиль деградации продукта.

Живые вирусные вакцины необходимо использовать сразу же после восстановления. Инактивированные вакцины нельзя замораживать. В большинстве стран запрещено включать консерванты в состав лиофилизированных живых вакцин, но можно использовать противомикробные консерванты, добавив их в разбавитель, который используется для восстановления вакцины. В качестве альтернативы, в США разрешается использование конкретных консервантов, которые должны быть указаны на этикетке.

3. Вакцины, основанные на биотехнологиях

3.1. Существующие вакцины и их преимущества

Появление метода рекомбинантных ДНК привело к разработке новых вирус-вакцин против БН. Один класс включает векторные вакцины, которые состоят из подходящего вируса-носителя, который экспрессирует один и более иммуногенных белков ВБН (обычно F и/или HN), таким образом, вызывая иммунный ответ как на ВБН, так и на сам векторный вирус. Примерами таких векторных вакцин могут служить рекомбинантные вакцины на основе вируса коровьей оспы (Meulemans, 1988), вируса оспы птиц (Boursnell *et al.*, 1990; Karaca *et al.*, 1998; Olabode *et al.*, 2010), вируса оспы голубей (Letellier *et al.*, 1991), герпесвируса индеек (Heckert *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1996), вируса болезни Марека (Sakaguchi *et al.*, 1998) и аденоассоциированного вируса птиц (Perozo *et al.*, 2008).

Другой подход включает разработку субъединичных вакцин, основанных на широкомасштабной экспрессии белков ВБН (обычно F и/или HN) с использованием бакуловирусных векторов (Fukanoki *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 1994; Nagy *et al.*, 1991) или растений (Berinstein *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007) и использовании ДНК-вакцины, т.е. плазмидных ДНК, кодирующих соответствующие иммуногенные белки ВБН (Loke *et al.*, 2005; Rajawat *et al.*, 2008). Внедрение системы обратной генетики в отношении ВБН (Peeters *et al.*, 1999; Romer-Oberdorfer *et al.*, 1999) делает возможной генетическую модификацию генома ВБН и разработку штаммов ВБН с новыми свойствами. Сюда входит применение серологической дифференциации (DIVA вакцины (Mebatsion *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2001) и встраивание и экспрессирование чужеродных генов, что делает сам ВБН вакцинным вектором при применении для домашней птицы (Nakaya *et al.*, 2001; 2010; Schroer *et al.*, 2009; Steel *et al.*, 2008) и других видов, включая приматов (Dinapoli *et al.*, 2007).

Целевые характеристики вирус-вакцин против БН включают: 1) предотвращение переноса; 2) дифференциация инфицированных животных от вакцинированных (DIVA); 3) обеспечение защиты после введения однократной дозы; 4) преодоление материнских антител; 5) массовая вакцинация; 6) перекрестная защита от вариантных штаммов, 7) повышенная безопасность и минимальные побочные действия. По своей эффективности некоторые из выше указанных вакцин достигают или превосходят традиционные вакцины по показателям образования антител или защиты от вирулентного штамма, используемого для контрольного заражения, и, таким образом, они имеют большие перспективы использования в будущем. Более того, они предлагают ряд преимуществ по сравнению с традиционными живыми вирус-вакцинами против БН, такими как i) повышенная безопасность для вакцинированной птицы вследствие отсутствия остаточной вирулентности, ii) применение принципа DIVA, и iii) большее иммуногенное соответствие с актуальными штаммами.

Очень мало выше указанных биотехнологических вакцин зарегистрированы в некоторых странах для применения для домашней птицы (VectorVax FP-N, Trovac-NDV, Innovax-ND). Проблема некоторых упомянутых здесь вакцин заключается в том, что существующий иммунитет против вектора может помешать применению таких вакцин в полевых условиях на стандартной основе. Вследствие того, что большинство векторных вакцин основаны на вирусах, которые сами по себе являются потенциальными патогенами для птиц, сложно гарантировать полную безопасность в полевых условиях. Кроме того, тот факт, что большинство этих вакцин являются генетически модифицированными организмами (ГМО), означает, что они должны подвергаться строгому и длительному исследованию и регистрации. Более того, производство биотехнологических вакцин, вероятно, более дорогостоящее, чем производство классических вирус-вакцин против БН. Так как используемые в настоящий момент классические вакцины являются дешевыми и подходящими, как минимум, для защиты домашней птицы от клинических признаков и гибели, у ветеринарных фармацевтических компаний отсутствует фактический стимул для разработки новых вакцин. Скорее всего, птицеводы захотят платить более высокую цену за вакцину только в том случае, если она предлагает значительные преимущества по сравнению с традиционными вакцинами. Данная ситуация вряд ли скоро изменится, если национальные или международные органы власти не изменят требования к вакцинам против БН, такие как минимальные требования к снижению выделения вируса для контрольного заражения или к использованию принципа DIVA.

Периодические вспышки БН вопреки вакцинации поднимают вопрос о том, являются ли используемые в настоящее время вакцины против БН все еще эффективными, не только для защиты от клинических признаков, но и для торможения передачи вируса (Карczynski & King, 2005). Действительно, было показано, что масштаб гомологии между вакцинным штаммом и штаммом для контрольного заражения важен для снижения выделения вирулентного вируса (Hu *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2007). Замена генов F и HN вакцинного штамма на соответствующие гены актуального штамма привело к появлению вакцины, которая может намного лучше снизить выделение вируса актуального штамма, чем немодифицированная вакцина. Данные результаты свидетельствуют в пользу адаптации классических вакцинных штаммов с целью улучшения антигенного соответствия между вакцинными и циркулирующими вирулентными штаммами ВБН.

3.2. Специальные требования к биотехнологическим вакцинам

Зарегистрированные и лицензированные однажды биотехнологические вакцины должны соответствовать тем же требованиям, что и классические вакцины, описанные выше (Раздел С: требования к вакцинам и диагностическим биопрепаратам).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ALDOUS E.W., MYNN J.K., BANKS J. & ALEXANDER D.J. (2003). A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.*, 32 (3), 239–256.

ALEXANDER D.J. & ALLAN W.H. (1974). Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol.*, 3 (4), 269–278.

ALEXANDER D.J., MANVELL R.J., LOWINGS J.P., FROST K. M., COLLINS M.S., RUSSELL P.H. & SMITH J.E. (1997). Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, 26 (2), 399–418.

ALEXANDER D. J. AND PARSONS G. (1986). Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-1985. *Avian Pathology*, 15, 487-493.

ALEXANDER D.J., PATTISON M. & MACPHERSON I. (1983). Avian Paramyxovirus of PMV-3 serotype in British turkeys. *Avian Pathol.*, 12, 469–482.

ALEXANDER D.J. & SENNE D.A. (2008a). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. In: *Diseases of Poultry*, Twelfth Edition, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 75–116.

ALEXANDER D.J. & SENNE D.A. (2008b). Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. In: *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.

ALLAN W.H., LANCASTER J.E. & TOTH B. (1978). *Newcastle Disease Vaccines*. FAO, Rome, Italy.

- BERINSTEIN A., VAZQUEZ-ROVERE C., ASURMENDI S., GOMEZ E., ZANETTI F., ZABAL O., TOZZINI A., CONTE GRAND D., TABOGA O., CALAMANTE G., BARRIOS H., HOPP E & CARRILLO E. (2005). Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine*, 23 (48–49), 5583–5589.
- VAN BOVEN M., BOUMA A., FABRI T.H., KATSMA E., HARTOG L. & KOCH G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathol.*, 37 (1), 1–5.
- BOURSNELL M.E., GREEN P.F., SAMSON A.C., CAMPBELL J.I., DEUTER A., PETERS R.W., MILLAR N.S., EMMERSON P.T. & BINNS M.M. (1990). A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology*, 178 (1), 297–300.
- BROWN J., RESURRECCION R.S. & DICKSON T.G. (1990). The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. *Avian Dis.*, 34 (3), 585–587.
- CATTOLI G., DE BATTISTI C., MARCIANO S., ORMELLI S., MONNE I., TERREGINO C. & CAPUA I. (2009). False-negative results of a validated real-time PCR protocol for diagnosis of Newcastle disease due to genetic variability of the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 3791–3792.
- CATTOLI G., FUSARO A., MONNE I., MOLIA S., LE MENACH A., MAREGEYA B., NCHARE A., BANGANA I., MAINA A.G., KOFFI J.N., THIAM H., BEZEID O.E., SALVIATO A., NISI R., TERREGINO C. & CAPUA I. (2010). Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa – implications for diagnosis and control. *Vet. Microbiol.*, 142, 168–176.
- CHANG P.W. (1981). Newcastle disease. In: *CRC Handbook Series in Zoonoses. Section B: Viral Zoonoses Volume II*, Beran G.W., ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, 261–274.
- CHO S.H., KWON H.J., KIM T.E., KIM J.H., YOO H.S., PARK M.H., PARK Y.H. & KIM S.J. (2008). Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15 (10), 1572–1579.
- CHOI K.S., LEE E.K., JEON W.J. & KWON J.H. (2010). Antigenic and immunogenic investigation of the virulence motif of the Newcastle disease virus fusion protein. *J. Vet. Sci.*, 11 (3), 205–211.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (CFR) (2009). Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
- COLLINS M.S., STRONG I. & ALEXANDER D.J. (1994). Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed “pigeon PMV-1 viruses”. *Arch. Virol.*, 134 (3–4), 403–411.
- CREELAN J.L., GRAHAM D.A. & MCCULLOUGH S.J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, 31 (5), 493–499.
- CZEGLEDI A., UJVARI D., SOMOGYI E., WEHMANN E., WERNER O. & LOMNICZI B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.*, 120 (1–2), 36–48.

- DINAPOLI J.M., YANG L., SUGUITAN A., ELANKUMARAN S., DORWARD D.W., MURPHY B.R., SAMAL S.K., COLLINS P.L. & BUKREYEV A. (2007). Immunization of primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine via the respiratory tract induces a high titer of serum neutralizing antibodies against highly pathogenic avian influenza virus. *J. Virol.*, 81 (21), 11560–11568.
- DORTMANS J.C., KOCH G., ROTTIER P.J. & PEETERS B.P. (2009). Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *J. Gen. Virol.*, 90 (Pt 11), 2746–2750.
- DORTMANS J.C., ROTTIER P.J., KOCH G. & PEETERS B.P. (2010). The viral replication complex is associated with virulence of Newcastle disease virus (NDV). *J. Virol.*, 84 (19), 10113–10120.
- EUROPEAN COMMISSION (1993). Commission Decision of 8 February 1993 laying down the criteria for vaccines to be used against Newcastle disease in the context of routine vaccination programmes (93/152/EEC): Official Journal of the European Communities L 59, 35 (Decision as amended by Decision 2010/633/EC: Official Journal of the European Union, L 279, 33).
- FUKANOKI S., IWAKURA T., IWAKI, S, MATSUMOTO K., TAKEDA R., IKEDA K., SHI Z. & MORI H. (2001). Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Avian Pathol.*, 30 (5), 509–516.
- FULLER C.M., BRODD L., IRVINE R.M., ALEXANDER D.J. & ALDOUS E.W. (2010). Development of an L gene real-time reverse-transcription PCR assay for the detection of avian paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. *Arch. Virol.*, 155, 817–823.
- GOEBEL S.J., TAYLOR J., BARR B.C., KIEHN T.E., CASTRO-MALASPINA H.R., HEDVAT C.V., RUSH-WILSON K.A., KELLY C.D., DAVIS S.W., SAMSONOFF W.A., HURST K.R., BEHR M.J. & MASTERS P.S. (2007). Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. *J. Virol.*, 81 (22), 12709–12714.
- GOULD A.R., KATTENBELT J.A., SELLECK P., HANSSON E., LA-PORTA A. & WESTBURY H.A. (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Res.*, 77 (1), 51–60.
- HECKERT R.A., RIVA J., COOK S., MCMILLEN J. & SCHWARTZ R.D. (1996). Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian Dis.*, 40 (4), 770–777.
- HU S., MA H., WU Y., LIU W., WANG X., LIU Y. & LIU X. (2009). A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine*, 27 (6), 904–910.
- KAPCZYNSKI D.R. & KING D.J. (2005). Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*, 23 (26), 3424–3433.
- KARACA K., SHARMA J.M., WINSLOW B.J., JUNKER D.E., REDDY S., COCHRAN M. & MCMILLEN J. (1998). Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and

Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following in ovo or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine*, 16 (16), 1496–1503.

KHAN T.A., RUE C.A., REHMANI S.F., AHMED A., WASILENKO J.L., MILLER P.J. & AFONSO C.L. (2010). Phylogenetic and biological characterization of Newcastle disease virus isolates from Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, 48 (5), 1892–1894.

KIM L.M., KING D.J., CURRY P.E., SUAREZ D.L., SWAYNE D.E., STALLKNECHT D.E., SLEMONS R.D., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., WINKER K. & AFONSO C.L. (2007). Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to poultry-origin isolates. *J. Virol.*, 81 (22), 12641–12653.

KIM L.M., KING D.J., GUZMAN H., TESH R.B., TRAVASSOS DA ROSSA A.P.A., BUENO R., DENNET J.A. & AFONSO C.L. (2008a). Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. *J. Clin. Microbiol.*, 46 (10), 3303–3310.

KIM L.M., SUAREZ D.L. & AFONSO C.L. (2008b). Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20 (4), 414–425.

KOUWENHOVEN B. (1993). Newcastle Disease In: *Virus Infection of Birds*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 341–4361.

LEE Y.J., SUNG H.W., CHOI J.G., LEE E.K., YOON H., KIM J.H. & SONG C.S. (2008). Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutininneuraminidase proteins. *J. Vet. Sci.*, 9 (3), 301–308.

LENSING H.H. (1974). Newcastle disease – live vaccine testing. *Dev. Biol. Stand.*, 25, 189–194.

LETELLIER C., BURNY A. & MEULEMANS G. (1991). Construction of a pigeonpox virus recombinant: expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge. *Arch. Virol.*, 118 (1–2), 43–56.

LIU H., ZHAO Y., ZHENG D., LV Y., ZHANG W., XU T., LI J. & WANG Z. (2011). Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses. *J. Virol. Methods*, 171 (1), 149–155. Epub 27 Oct. 2010.

LOKE C.F., OMAR A.R., RAHA A.R., & YUSOFF K. (2005). Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 106 (3–4), 259–267.

MAAS R.A., OEI H.L., KEMPER S., KOCH G. & VISSER L. (1998). The use of homologous virus in the haemagglutination-inhibition assay after vaccination with Newcastle disease virus strain La Sota or Clone30 leads to an over estimation of protective serum antibody titres. *Avian Pathol.*, 27 (6), 625–631.

MEBATSION T., KOOLEN M. J., DE VAAN L. T., DE HAAS N., BRABER M., ROMER-OBERDORFER A., VAN DEN ELZEN, P. & VAN DER MARCEL P. (2002). Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. *J. Virol.*, 76 (20), 10138–10146.

- MEULEMANS G. (1988). Newcastle disease virus F glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. *Avian Pathol.*, 17, 821–827.
- MEULEMANS G., VAN DEN BERG T.P., DECAESSTECKER M. & BOSCHMANS M. (2002). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathol.*, 31 (5), 515–519.
- MILLER P.J., AFONSO C.L., SPACKMAN E., SCOTT M.A., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., BROWN J.D., FULLER C.M., UHART M.M., KARESH W.B., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & SWAYNE D.E. (2010a). Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, 84 (21), 11496–11504.
- MILLER P.J., DECANINI E.L. & AFONSO C.L. (2010b). Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect. Genet. Evol.*, 10 (1), 26–35.
- MILLER P.J., KING D.J., AFONSO C.L. & SUAREZ D.L. (2007). Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*, 25 (41), 7238–7246.
- MORGAN R.W., GELB J., SCHREURS C.S., LUTTICKEN D., ROSENBERGER J.K. & SONDERMEIJER P.J. (1992). Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis.*, 36 (4), 858–870.
- MORI H., TAWARA H., NAKAZAWA H., SUMIDA M., MATSUBARA F., AOYAMA S., IRANTI Y., HAYASHI Y. & KAMOGAWA K. (1994). Expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus. *Avian Dis.*, 38 (4), 772–777.
- NAGY E., HUBER P., KRELL P.J. & DERBYSHIRE J.B. (1991). Synthesis of Newcastle disease virus (NDV)-like envelopes in insect cells infected with a recombinant baculovirus expressing the haemagglutinin-neuraminidase of NDV. *J. Gen. Virol.*, 72 (Pt 3), 753–756.
- NAKAYA T., CROS J., PARK M.S., NAKAYA Y., ZHENG H., SAGRERA A., VILLAR E., GARCIA-SASTRE A. & PALESE P. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J. Virol.*, 75 (23), 11868–11873.
- NAYAK B., KUMAR S., DINAPOLI J.M., PALDURAI A., PEREZ D.R., COLLINS P.L. & SAMAL S.K. (2010). Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *J. Virol.*, 84 (5), 2408–2420.
- NANTHAKUMAR T., KATARIA R.S., TIWARI A.K., BUTCHIAIAH G. & KATARIA J.M. (2000). Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Commun.*, 24, 275–286.
- OLABODE A.O., NDAKO J.A., ECHEONWU G.O., NWANKITI O.O. & CHUKWUEDO A.A. (2010). Use of cracked maize as a carrier for NDV4 vaccine in experimental vaccination of chickens. *Virol. J.*, 7, 67.
- PEETERS B.P., DE LEEUW O.S., KOCH G. & GIELKENS A.L. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.*, 73 (6), 5001–5009.

- PEETERS B.P., DE LEEUW O.S., VERSTEGEN I., KOCH G. & GIELKENS A.L. (2001). Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, 19 (13–14), 1616–1627.
- PEROZO F., VILLEGAS P., ESTEVEZ C., ALVARADO I.R., PURVIS L.B. & SAUME E. (2008). Avian adeno-associated virusbased expression of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein for poultry vaccination. *Avian Dis.*, 52 (2), 253–259.
- RAJAWAT Y.S., SUNDARESAN N.R., RAVINDRA P.V., KANTARAJA C., RATTA B., SUDHAGAR M., RAI A., SAXENA V.K, PALIA S.K. & TIWARI A.K. (2008). Immune responses induced by DNA vaccines encoding Newcastle virus haemagglutinin and/or fusion proteins in maternal antibody-positive commercial broiler chicken. *Br. Poult. Sci.*, 49 (2), 111–117.
- REDDY S. K., SHARMA J. M., AHMAD J., REDDY D.N., MCMILLEN J.K., COOK S.M., WILD M.A & SCHWARTZ R.D. (1996). Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, 14 (6), 469–477.
- ROMER-OBERDORFER A., MUNDT E., MEBATSION T., BUCHHOLZ U.J. & METTENLEITER T.C. (1999). Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J. Gen. Virol.*, 80 (Pt 11), 2987–2995.
- SAKAGUCHI M., NAKAMURA H., SONODA K., OKAMURA H., YOKOGAWA K., MATSUO K. & HIRA K. (1998). Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. *Vaccine*, 16 (5), 472-479.
- SCHROER D., VEITS J., GRUND C., DAUBER M., KEIL G., GRANZOW H., METTENLEITER T.C. & ROMER-OBERDORFER A. (2009). Vaccination with Newcastle disease virus vectored vaccine protects chickens against highly pathogenic H7 avian influenza virus. *Avian Dis.*, 53 (2), 190–197.
- SHENGQING Y., KISHIDA N., ITO H., KIDA H., OTSUKI K., KAWAOKA Y. & ITO T. (2002). Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. *Virology*, 301 (2), 206–211.
- STEEL J., BURMAKINA S.V., THOMAS C., SPACKMAN E., GARCIA-SASTRE A., SWAYNE D.E. & PALESE P. (2008). A combination in-ovo vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus. *Vaccine*, 26 (4), 522–531.
- STONE H.D., BONEY W.A. JR, CORIA M.F. & GILLETTE K.G. (1975). Viscerotropic velogenic Newcastle disease in turkeys: vaccination against loss of egg production. *Avian Dis.*, 19 (1), 47–51
- SWAYNE D.E. & KING D.J. (2003). Avian influenza and Newcastle disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 222 (11), 1534–1540.
- TERREGINO C. & CAPUA I. (2009). Clinical traits and pathology of Newcastle disease infection and guidelines for farm visit and differential diagnosis. In: *Avian Influenza and Newcastle Disease*, Capua I., ed. AD Springer Milan, Milan, Italy.
- THAYER S.G. & BEARD C.W. (2008). Serologic Procedures. In: *A Laboratory Manual for the Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Fifth Edition, Dufour-Zavala L., ed. American Association of Avian Pathologists, USA, pp. 222–229.

WAMBURA P.N. (2011). Formulation of novel nano-encapsulated Newcastle disease vaccine tablets for vaccination of village chickens. Trop. Anim Health Prod., 43 (1), 165–169.

WISE M.G., SUAREZ D.L., SEAL B.S., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., KING D.J., KAPCZYNSKI D. & SPACKMAN E. (2004). Development of a real -time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. J. Clin. Microbiol., 42, 329–338.

YANG Z.Q., LIU Q.Q., PAN Z.M., YU H.X. & JIAO X.A. (2007). Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. Vaccine, 25 (4), 591–598.

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по болезни Ньюкасла (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или обратитесь на сайт МЭБ для получения наиболее актуального списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Дополнительную информацию о диагностических тестах, реактивах и вакцинах против болезни Ньюкасла можно получить в Референтных лабораториях МЭБ