

ГЛАВА 3.3.9.

ПАСТЕРЕЛЛЕЗ ПТИЦ

РЕЗЮМЕ

Холера птиц (пастереллез птиц) - часто встречающаяся болезнь птиц, способная поражать все типы птиц и распространенная по всему миру. Вспышки пастереллеза птиц часто проявляются в виде острой фатальной септицемии, главным образом у взрослых птиц. Также наблюдаются хронические и бессимптомные инфекции. Диагностика зависит от выделения и идентификации бактерии-возбудителя, Pasteurella multocida. Предварительный диагноз может быть поставлен на основании наличия типичных признаков и поражений и/или микроскопической демонстрации огромного количества бактерий в мазках крови или мазках-отпечатках тканей, таких как печень или селезенка. В местах, где болезнь является эндемичной, также наблюдаются легкая или хроническая формы болезни с локализацией инфекции, главным образом, в дыхательной и скелетной системах.

Идентификация возбудителя: *Pasteurella multocida* легко поддается выделению, часто в чистой культуре, из висцеральных органов, таких как легкие, печень и селезенка, костный мозг, гонады или кровь сердца птиц, погибших от острой формы болезни, характеризующейся наличием бактерий в крови, или из казеозного экссудата, характерного для хронических поражений при пастереллезе птиц. Данная бактерия является факультативной анаэробной бактерией, которая лучше всего растет при 37°C. Первичное выделение обычно проводят с использованием сред, таких как декстрозно-крахмальный агар, кровяной агар и триптиказо-соевый агар. Процедуру выделения можно усовершенствовать путем добавления 5% термо-инактивированной сыворотки. Колонии варьируют от 1 до 3 мм в диаметре через 18-24 часов инкубации, являются дискретными, имеют форму кольца, выпуклые, полупрозрачные и маслянистые. Клетки – коккобациллярные, в форме короткого стержня, размером 0,2-0,4 x 0,6-2,5 мкм, грамотрицательные и обычно присутствуют в виде одиночных или парных клеток. Наглядным является биполярное окрашивание с помощью красителей Райта или Гимзы.

Идентификация P. multocida производится на основании результатов биохимических тестов, включающих ферментацию углеводов, продуцирование ферментов и избирательное продуцирование метаболитов.

Серологическая характеристика штаммов P. multocida включает капсульное серогруппирование и соматическое серотипирование. Капсульное и соматическое типирование можно также произвести с помощью методов на основе полимеразной цепной реакции. С помощью ДНК фингерпринтинга можно дифференцировать P. multocida, имеющих одну и ту же капсулярную серогруппу и соматический серотип. Такое определение характеристик следует проводить в специализированной лаборатории с использованием соответствующих диагностических реагентов.

Серологические тесты: Серологические тесты редко используют для диагностики пастереллеза птиц. Не вызывающая затруднений постановка окончательного диагноза посредством выделения и идентификации организма-возбудителя, в целом, исключает необходимость проведения серодиагностики.

Требования к вакцинам: Используемые вакцины против *P. multocida*, в основном, представляют собой бактерии, содержащие гидроокись алюминия или масло в качестве адъюванта, полученные из нескольких серотипов. Обычно требуется две дозы убитой вакцины. Живые культуральные вакцины способствуют выработке более сильного защитного иммунитета, но применяются не так часто из-за возможных поствакцинальных осложнений, таких как пневмония и артрит. Поливалентные вакцины обычно содержат соматические серотипы 1, 3 и 4, поскольку они являются чаще всего выделяемыми серотипами птиц. Тестирование бактерий на безопасность и иммуногенность обычно проводится на животных-хозяевах. Конечные контейнеры с живыми культурами тестируют на иммуногенность посредством определения количества бактерий.

А. ВВЕДЕНИЕ

Пастереллез птиц – контагиозное бактериальное заболевание домашних и диких видов птиц, вызываемое заражением *Pasteurella multocida*. Обычно он возникает в виде бурно протекающей болезни с массивной бактериемией и высокой заболеваемостью и смертностью у птиц старшего возраста. Также наблюдаются и хронические инфекции с клиническими признаками и поражениями релевантными для мест локализации инфекций. Часто местом хронической инфекции становятся легочная система и ткани, ассоциированные со скелетно-мышечной системой. Пастереллез птиц также часто называют холерой птиц и геморрагической септициемией птиц. Не считается, что пастереллез птиц имеет зоонозный потенциал, поскольку изоляты, выделенные у птиц, обычно являются непатогенными для млекопитающих, подвергаемых воздействию данных изолятов пероральным и подкожными путями. У кур могут также присутствовать и другие бактериальные болезни, включая сальмонеллез, колибациллез и листериоз, а у индеек – псевдотуберкулез, рожа и хламидиоз с клиническими признаками и поражениями сходными с таковыми при пастереллезе птиц. Дифференциацию производят на основании результатов процедуры выделения и идентификации, поскольку культивирование *Pasteurella multocida*, выделенной у птиц с пастереллезом птиц, не вызывает трудностей.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Пастереллез птиц (холера птиц) – часто встречающаяся болезнь птиц, которая может поражать все типы птиц и часто бывает фатальной (Derieux, 1978; Glisson *et al.* 2013). В сверхострой форме пастереллез птиц представляет собой одну из наиболее вирулентных и инфекционных болезней домашней птицы. В основе диагностики лежит идентификация бактерии-возбудителя, *P. multocida*, после её выделения у птиц с признаками и поражениями, сообразующимися с данной болезнью. Предварительный диагноз можно поставить на основании наличия типичных признаков и поражений и/или микроскопической демонстрации бактерий с биполярным окрашиванием в мазках тканей, таких как кровь, печень или селезенка. Могут наблюдаться легкие формы болезни.

К *P. multocida* восприимчивы все виды птиц, хотя наиболее сильно могут поражаться индейки. Главным образом поражаются птицы в возрасте старше 16 недель. Часто первым

признаком болезни являются мертвые птицы. Другие признаки включают: лихорадку, отсутствие аппетита, угнетение, слизистые выделения из ротовой полости, диарею, взъерошенные перья, снижение яйценоскости вместе с откладыванием яиц меньшего размера, учащенное дыхание и цианоз в момент гибели. Наиболее часто наблюдаются следующие поражения: застой в органах с серозными геморрагиями, увеличенная печень и селезенка, множественные маленькие некротические очаги в печени и/или селезенке, пневмония и слабые асциты и перикардальная опухоль. У птиц, оставшихся в живых после стадии острой септицемии, или птиц, инфицированных организмами с низкой вирулентностью, может наблюдаться развитие хронической формы пастереллеза птиц, характеризующей локализованными инфекциями. Эти инфекции часто охватывают суставы, подушечки лап у птиц, сухожильные влагалища, грудинную синовиальную сумку, конъюнктиву, сережки, гортань, легкие, воздухоносные мешки, среднее ухо, костный мозг и мягкие мозговые оболочки. Поражения, возникшие в результате этих инфекций, обычно характеризуются бактериальной колонизацией с некрозом, фибринозно-гнойным экссудатом и фиброплазией различной степени.

В основе диагностики лежит выделение и идентификация организма-возбудителя.

Таблица 1. Имеющиеся методы тестирования для диагностики пастереллеза птиц и их цель

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельных животных от инфекции перед перемещением	Способствует осуществлению политики искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции-надзор	Иммунный статус у отдельный животных или популяций после вакцинации
Выделение возбудителя¹¹						
Культивирование	-	-	-	+++	-	-
Выявление иммунного ответа						
Серологический ИФА	-	-	-	-	-	++

Примечание: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, достоверность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для этой цели.

Хотя не все данные тесты, перечисленные как категория +++ или ++ прошли официальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что они широко применяются без получения неоднозначных результатов, делает их приемлемыми. ИФА= иммуноферментный анализ (ELISA).

1. Идентификация возбудителя

Pasteurella multocida является факультативной анаэробной бактерией, которая лучше всего растет при 35-37°C. Первичное выделение обычно осуществляется с использованием сред, таких как кровяной агар, триптиказо-соевый агар или декстрозно-крахмальный агар; процедуру выделения можно усовершенствовать посредством добавления в эти среды 5% термоинактивированной сыворотки. Для поддерживающей среды добавление сыворотки обычно не требуется. Через 18-24 часа инкубации размер колоний варьирует от 1 до 3 мм в диаметре. Они обычно дискретные, имеют форму

¹ Рекомендуется использовать комбинацию методов идентификации возбудителя при исследовании одного и того же клинического образца.

кольца, выпуклые, полупрозрачные и маслянистые. Инкапсулированные организмы обычно продуцируют более крупные колонии по сравнению с колониями, продуцируемыми неинкапсулированными организмами. Водянистые слизистые колонии, часто наблюдаемые в изолятах из дыхательных путей млекопитающих, у птиц встречаются крайне редко. Клетки – коккобацилярные, в форме короткого стержня, обычно размером 0,2-0,4 x 0,6-2,5 мкм, грам-отрицательные и в основном присутствуют в виде одиночных или парных клеток. Недавно выделенные организмы или организмы, выявленные в мазках тканей, демонстрируют биполярное окрашивание при использовании красителей Райта и Гимзы или метиленового синего и обычно являются инкапсулированными.

Выделение организма из висцеральных органов, таких как печень, костный мозг, селезенка или кровь из сердца птиц с острой формой болезни или из экссудативных поражений у птиц с хронической формой болезни обычно не представляет никаких сложностей. Выделение организма у тех хронически пораженных птиц, у которых отсутствуют проявления болезни, кроме истощения и вялости, часто затруднено. В данном случае или при разложении хозяина для процедуры выделения лучше всего использовать костный мозг. Поверхность ткани, предназначенной для культивирования, прижигают горячим шпателем и получают образец, внедрив стерильную ватную палочку, проволоку или пластиковую петлю через термостерилизованную поверхность. Альтернативно, можно разрезать стерилизованную поверхность стерильными ножницами/скальпелем и внедрить в разрез тампон или петлю, не касаясь внешней поверхности. Данный образец наносят прямо на агаровую среду или в триптозную среду или среду в виде другого бульона и инкубируют в течение 2-3 часов, переносят на агаровую среду и снова инкубируют.

Идентификацию проводят главным образом на основании результатов биохимических тестов. Реакции ферментации углеводов являются основными. Поддающиеся ферментации углеводы включают: глюкозу, маннозу, галактозу, фруктозу и сахарозу. Неферментируемые углеводы включают: рамнозу, целлобиозу, раффинозу, инулин, эритритол, адонитол, м-инозитол и салицин. Маннитол обычно ферментируется. Арабиноза, мальтоза, лактоза и декстрин обычно не ферментируются. Варибельные реакции наблюдаются для ксилозы, трехалозы, глицерина и сорбитола. *Pasteurella multocida* не индуцирует гемолиз, не подвижна и лишь в редких случаях растет на агаре МакКонки. Она продуцирует каталазу, оксидазу и орнитин декарбоксилазу, но не продуцирует уреазу, лизин декарбоксилазу, бета-галактозидазу или аргинин дигидролазу. Продуцирование фосфатазы варьирует. Происходит восстановление нитрата, продуцирование индола и сульфида водорода, тесты с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра дают отрицательные результаты. Для обнаружения продуцирования сульфида водорода могут понадобиться пропитанные ацетатом свинца бумажные полоски, подвешенные над модифицированной H₂S жидкой средой Glisson et al., 2008). Имеются коммерческие наборы для проведения биохимических тестов. Методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут сделать возможным экспресс идентификацию колоний *P. multocida*. Однако нет опубликованных данных об абсолютно специфичном ДНК-тесте для идентификации *P. multocida* (Miflin & Blackall, 2001).

Дифференциацию *Pasteurella multocida* от других видов *Pasteurella* spp. птиц и *Riemerella (Pasteurella) anatipestifer* можно произвести с помощью тестов и результатов, указанных в таблице 2. Лабораторный опыт показывает, что *Pasteurella multocida* легче всего идентифицировать по морфологии колоний и её внешнему виду в красителях Грама. Наиболее полезными биохимическими индикаторами являются положительные реакции на индол и орнитин декарбоксилазу.

Таблица 2. Тесты, применяемые для дифференциации *Pasteurella multocida* от других видов *Pasteurella* птиц и *Riemerella anatipestifer*

Тест*	<i>Pasteurella</i>		<i>Riemerella anatipestifer</i>
	<i>multocida</i>	<i>gallinarum</i>	
Гемолиз на кровяном агаре	~*	~	В
Рост на агаре МакКонки	~	~	~
Продуцирование индола	.	~	~
Разжижение желатина	~	~	.o/p
Продуцирование каталазы	.	.	.
Продуцирование уреазы	~	~	В
Ферментация глюкозы	.	.	~
Ферментация лактозы	~o/np	~	~
Ферментация сахарозы	.	.	~
Ферментация мальтозы	~o/np	.	~
Орнитин декарбоксилаза	.	~	~

*Результаты реакций в тесте: ~ = реакция отсутствует; . = реакция присутствует; в= переменные реакции; ~o/np= обычно реакции нет; .o/p= обычно реакция есть.

Антигенная характеристика *Pasteurella multocida* производится посредством капсульного серогруппирования и соматического серотипирования. Капсульные серогруппы определяются посредством реакции пассивной гемагглютинации (Carter, 1955; 1972). Капсульные серогруппы являются следующими: А, В, D, Е и F. Все серогруппы, кроме серогруппы Е, были выделены у хозяев-птиц. Для дифференциации серогрупп А, D и F был разработан несерологический тест посредством диско-диффузного метода, в котором используются специфичные мукополисахариды (Rimler, 1994). Разработан специфичный анализ капсульных вариантов на основе мультиплексной ПЦР, который позволяет производить быстрое и специфичное капсульное типирование (Townsend *et al.*, 2001).

Определение соматических серотипов обычно производят посредством реакции иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) (Heddleston, 1962; Heddlestone *et al.*, 1972). Сообщалось о наличии серотипов 1 – 16; все 16 серотипов были выделены от хозяев-птиц (Glisson *et al.*, 2013). Наиболее эффективная характеристика включает определение и серогруппы, и серотипа. Данное определение необходимо производить в специализированной лаборатории, в которой имеются соответствующие диагностические реагенты. Для определения серотипа в лаборатории осуществляется приготовление неизвестной бактериальной культуры в качестве антигена для теста посредством реакции иммунодиффузии в агаровом геле, а затем данную культуру необходимо протестировать против всех 16 серотип-специфическими антисывороток. Антигены, присутствующие в отдельном изоляте, могут вступать в реакцию с многими серотип-специфическими антисыворотками, что приводит к тому, что существуют би- или триномиальные серотипы, как продемонстрировано 3, 4 и 3, 4, 12 штаммами (Glisson *et al.*, 2013). Высоко специфичный анализ методом мультиплексной ПЦР позволяет дифференцировать все 16 соматических серотипов. Данный анализ был признан более точным и менее трудоемким, чем традиционное типирование (Harper *et al.*, 2015).

1.1. Процедура соматического типирования с помощью реакции диффузной преципитации в геле

1.1.1. Процедура теста

- i) Произвести посев клеток из чистой культуры *Pasteurella multocida* на планшет с декстрозно-крахмальным агаром (20 x 150 мм, содержащем 70 мл среды, или два планшета размером 15 x 100 мм, каждый из которых содержит 20 мл среды) с помощью стерильного ватного тампона. Культуру при нанесении следует распределить тампоном всей поверхности планшета(-ов). Инкубировать планшет(-ты) при температуре 37°C в течение 18-24 часов в инкубаторе. Данная процедура применяется для получения антигена с последующим его использованием в качестве положительного контроля или для получения антигена из диагностических культур.
- ii) Произвести сбор урожая клеток с планшета(-ов), используя 2,5 мл 0,85% солевого раствора с 0,6% формальдегидом и стерильную палочку. Поместить клетки в пробирку с помощью стерильной пипетки.
- iii) Автоклавировать клетки при 100°C в течение 1 часа.
- iv) Центрифугировать смесь клеточной суспензии при 13 300 g в течение 20 минут.
- v) Удалить супернатант и поместить в стерильную пробирку.
- vi) Подготовить агаровый гель для использования в реакции диффузной преципитации в геле (GDPT), поместив 17,0 г NaCl, 1,8 г нобль-агара и 200 мл дистиллированной воды в 500 мл колбу. Разогреть содержимое колбы с неплотно прикрытой крышкой в микроволновой печи в течение 2,5 минут. Повращать содержимое колбы, и снова поставить в микроволновую печь на 2,5 минуты. Оставить агар на 10-15 минут, чтобы он слегка остыл. Не следует готовить агар в объеме меньшем, чем 200 мл, в микроволновой печи. Дегидратирование во время процесса микроволнового воздействия может увеличить концентрацию агара и негативно сказаться на диффузии или подавить её.
- vii) Помесить 5 мл растопленного агара на поверхность 75 x 25 мм гладкого предметного стекла для микроскопа. Важно выровнять стекла перед нанесением и распределением агара по стеклу. Оставить агар до полного остывания (примерно на 30 минут).
- viii) Вырезать лунки в агаровой подложке. Лунки должны быть 3 мм в диаметре и находиться на расстоянии 3 мм от края одной лунки до края другой лунки. Часто для получения двух или трех репликатов лунок на одном предметном стекле используют шаблон Оухтерлони. Каждый репликат имеет центральную лунку и окружен четырьмя лунками, расположенными под углом 90° (от центра).
- ix) Эталонную антисыворотку всегда помещают в центральную лунку (репликата). Антиген из диагностической или эталонной культуры помещают в одну из лунок окружающих репликат. Каждую лунку заполняют на весь объем.
- x) Предметные стекла инкубируют во влажной камере при 37°C в течение 48 часов в инкубаторе. Линии преципитина в реакции лучше всего видны при приглушенном освещении стекла снизу. Реакции, при их наличии, должны наблюдаться в виде арки преципитина между центральной и окружающей лункой(-ками). Иногда эти реакции наблюдаются близко к краю лунки. Следует

тщательно исследовать предметные стекла. Диагностические культуры могут вступать в реакцию с более чем одной эталонной соматической антисывороткой.

- xi) Следует использовать положительные контроли. Каждый раз, когда проводится тест, следует проводить тестирование эталонной сыворотки к эталонному антигену.

Для соматического типирования с помощью анализа методом мультплексной ПЦР в качестве основы используются гены липополисахаридов (ЛПС), экспрессированные различными штаммами по типу Heddlestone, и данный анализ является надежным и быстрым для осуществления соматического типирования.

ДНК фингерпринтинг *Pasteurella multocida* посредством анализа с помощью рестрикционных нуклеаз (REA) был признан полезным для эпизоотологических исследований пастереллеза птиц в стадах домашней птицы. С помощью данного анализа можно дифференцировать изоляты *Pasteurella multocida*, которые имеют общую и капсулярную серогруппу, и соматический серотип. Проводится анализ окрашенных этидиум-бромидом агарозных гелей после электрофореза ДНК, расщепленной либо *HpaI*, либо *HpaII* эндонуклеазой (Wilson *et al.*, 1992).

2. Серологические тесты

Серологические тесты на наличие специфичных антител не используются для диагностики пастереллеза птиц. Поскольку достоверный диагноз можно легко поставить посредством выделения и идентификации организма-возбудителя, в серодиагностике нет необходимости. Серологические тесты, такие как реакция агглютинации, реакция иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) и реакция пассивной гемагглютинации, использовали в экспериментальных условиях для демонстрации антител против *Pasteurella multocida* в сыворотке, полученной от птиц - хозяев; ни один из них не был высокочувствительным. Предпринимались попытки, с различным успехом, использовать определение титров антител с помощью иммуноферментных анализов для мониторинга сероконверсии у вакцинированной домашней птицы, но не для диагностики.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

С1. Инактивированная вакцина

1. Общая информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование продукта

Любые из 16 Heddlestone серотипов *Pasteurella multocida* могут вызывать пастереллез птиц, хотя с болезнью, по-видимому, более часто ассоциированы лишь определенные серотипы. В основном используемые вакцины против *Pasteurella multocida*, являются инактивированными, содержащими гидроокись алюминия или масляный адьювант, полученные из клеток серотипов, выбранных на основании эпизоотологической информации. Коммерческие вакцины обычно состоят из серотипов 1, 3 и 4. Вакцинация играет значимую роль в контроле данной болезни. Руководство по производству ветеринарных вакцин изложено в Главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, представленные в данной главе и в Главе 1.1.8., намеренно являются общими по

своей природе и могут быть дополнены национальными или региональными требованиями.

Инактивированную вакцину обычно вводят посредством внутримышечной инъекции в мышцы ноги или груди или подкожно в заднюю часть шеи. Обычно вводят 2 дозы с интервалом в 2-4 недели. Как и при применении большинства убитых вакцин выработки иммунитета в полном объеме можно ожидать только по истечении приблизительно 2 двух недель после введения второй дозы в ходе первичного курса вакцинации. Следует избегать вакцинации больных птиц или птиц с плохой упитанностью, поскольку в таких случаях можно не получить удовлетворительного иммунного ответа.

2. Основные принципы производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Все штаммы *P. multocida*, включаемые в вакцину, должны быть хорошо охарактеризованы, должны принадлежать к известному серотипу, должны быть чистыми, безопасными и иммуногенными. См. Главу 1.1.8., где изложены руководства по исходным посевным материалам.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от чужеродных агентов)

Посевной материал *Pasteurella multocida* должен представлять собой чистую культуру и быть свободным от чужеродных бактерий и грибов (См. Главу 1.1.9. *Тесты биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*).

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Пригодность в качестве вакцинного штамма демонстрируется в тестах по определению эффективности и безопасности.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Приготовление производственных культур каждого бактериального изолята, предназначенного для включения в конечный продукт осуществляется отдельно. Культуры *Pasteurella multocida* могут быть выращены в подходящей среде в виде бульона или могут быть первоначально выращены на агаровой среде, а их наработка для увеличения объема может производиться на бульонной среде. Культуры субпассируют до получения желаемого объема. Сбор урожая культур производится, когда они достигают определенной плотности, которая часто определяется посредством спектрофотометрии (оптическая плотность).

Затем культуры инактивируют формалином или другим подходящим инактивантом. Инактивированный урожай культуры можно концентрировать, обычно посредством центрифугирования или фильтрации или разбавить для получения надлежащей концентрации для составления конечного продукта. Все стандартизированные компонентные культуры перемешивают и обычно добавляют адьювант, а затем фасуют в стерильные конечные контейнеры.

2.2.2. Требования к ингредиентам

См. Главу 1.1.8.

2.2.3. Контроль в процессе производства

Чистоту культур определяют на каждом этапе производства до стадии инактивации. Это можно производить посредством микроскопического исследования (например, фазово-контрастная микроскопия, грам-окрашивание) и/или посредством культивирования. Убитые культуры тестируют на полноту инактивации. Аналитические анализы для определения уровней формальдегида и других консервантов производят на нефасованной вакцине, выявленные уровни таких консервантов должны быть в установленных пределах. Во время изготовления необходимо строго контролировать производственные параметры, чтобы гарантировать, что все серии (партии) произведены таким же образом, какой был использован для производства серий, использованных для исследований на эффективность.

2.2.4. Тесты на партии готового продукта

i) Стерильность/чистота

Тесты на стерильность проводятся на фасованной вакцине. Каждая партия должна соответствовать требованиям к стерильности, например, таковым, подробно изложенным в 9 CFR, Часть 113.26 или 113.27 (CFR, USDA, 2013). (См. также Главу 1.1.9).

ii) Идентичность

Идентичность антигенов в инактивированных продуктах обычно гарантируется соблюдением основных требований к получению исходного посевного материала и осуществлением контроля за соблюдением правил надлежащей производственной практики. В США проведение отдельного тестирования на идентичность на партиях готовой продукции не требуется, но в других странах процедуры могут отличаться.

iii) Безопасность

Каждая партия нефасованной и фасованной вакцины тестируется на безопасность, и оценку степени безопасности можно производить на птицах, вакцинированных для проведения тестирования партии на иммуногенность.

Определенные страны или регионы, такие как Европейский Союз (ЕС), также могут требовать проведения тестирования каждой партии на содержание эндотоксина.

iv) Иммуногенность партии

В США инактивированные вакцины обычно тестируют на иммуногенность партии посредством проведения вакцинации с последующим контрольным заражением, как описано в 9 CFR, Части 113.116 – 118 (USDA, 2013). Отдельные группы птиц (20 вакцинированных и 10 контрольных) контрольно заражают каждым из серотипов *P. multocida*, защита от которого заявлена. Вакцины вводят в дозе и путем, рекомендованными на этикетке, и всех птиц контрольно заражают через 2 недели после введения второй дозы. За птицами производят наблюдение в течение 14 дней после контрольного заражения. Для признания результатов теста удовлетворительными в соответствии с 9 CFR в живых должны остаться не менее 14 из 20 вакцинированных птиц и не менее 8 из 10 контрольных птиц должны погибнуть.

В ЕС можно использовать серологический тест или другой валидированный метод для определения иммуногенности партии после первоначального тестирования партии с минимальной допустимой иммуногенностью в опыте по вакцинированию с последующим контрольным заражением (European Pharmacopoeia, 2008).

v) Содержание формалина

Вакцины, инактивированные формалином, тестируется на остаточный формалин.

2.3. Требования к разрешению/регистрации/лицензированию

В основу следующего раздела положены требования к инактивированным вакцинам против *P. multocida* в США. В других странах требования могут немного отличаться.

2.3.1. Процесс изготовления

Основной метод, используемый производителями для изготовления, должен демонстрировать, что процедура, используемая для инактивации бактерий, является достаточной для полной инактивации. Следует разработать тест для подтверждения инактивации каждой бактериальной культуры.

2.3.2. Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Инактивированные вакцины не должны представлять опасность для нецелевых видов животных. Оценку степени безопасности для целевых животных можно производить в соответствии с гармонизированными требованиями, указанными в VICH GL 44 (VICH, 2009). ЕС и США рекомендуют проводить вакцинацию, как минимум, 20 неиммунных, не подвергавшихся воздействию птиц в соответствии с рекомендациями, указанными на этикетке, и последующее ежедневное обследование данных птиц на наличие неблагоприятных реакций. В ЕС мониторинг

производится в течение 21 дня. В США безопасность для целевых животных оценивается во время периода перед контрольным заражением при проведении исследования на эффективность, который обычно составляет 5 недель.

ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин и по соображениям охраны окружающей среды

Не применяется.

iii) Меры предосторожности (опасности)

Вакцины, приготовленные с использованием адъювантов на основе алюминия, могут вызвать образование временных узелковых утолщений в месте инъекции. Самовведение препарата не вызывает немедленных проблем у оператора, но все же следует обратиться за консультацией к врачу, ввиду имеющегося риска инфицирования через контаминированную иглу.

Вакцины, приготовленные с использованием масляных адъювантов, могут вызывать более серьезные реакции в месте инъекции, которые могут проявляться в виде больших узелковых утолщений. Следует соблюдать осторожность и вводить такие вакцины правильно. В случае самовведения оператору требуется немедленная медицинская помощь, включая безотлагательное рассечение и промывание данного участка введения.

2.3.3. Требования к эффективности

Необходимо продемонстрировать, что продукты, полученные из кандидатных исходных посевных материалов, эффективно защищают от контрольного заражения. Необходимо продемонстрировать эффективность продукта для каждого вида животных (например, куры, индейки) и при введении каждым из путей, для которых она рекомендована. Следует продемонстрировать предоставление защиты от контрольного заражения каждым из серотипов, защита от которых заявлена. Птицы, используемые для исследования эффективности, должны быть иммунологически интактными в отношении пастереллеза птиц и минимального возраста, рекомендуемого для использования продукта. Партия продукта, используемого для демонстрации эффективности, должна быть произведена из исходного посевного материала наивысшего разрешенного пассажа.

В США и ЕС в каждом исследовании эффективности используются 20 вакцинированных птиц и 10 контрольных. Птиц контрольно заражают не ранее чем через 14 (США) и 21 (ЕС) дней после вакцинации и наблюдают за ними в течение 14 дней после контрольного заражения. В США определяется уровень смертности и для признания результатов тестов удовлетворительными требуется, чтобы, как минимум, восемь контролей погибли и не менее 16 вакцинированных птиц остались живыми (USDA, 2013). В ЕС ожидается отсутствие у птиц серьезных признаков болезни, и результаты тестирования считаются удовлетворительными, если 70%

контрольных птиц были поражены, в то время как не менее 70% вакцинированных птиц оставались свободными от болезни (European Pharmacopoeia, 2008).

2.3.4. Вакцины, позволяющие использовать DIVA стратегию (выявление инфекции у вакцинированных животных)

К данной болезни не применимо.

2.3.5. Продолжительность иммунитета

Формально проведения исследований с целью определения продолжительности иммунитета обычно не требуется, хотя важно проверять, каковы требования отдельных стран в этом отношении. Рекомендации по повторной вакцинации, кроме первичной серии вакцинации, чаще всего определяются практическим путем.

2.3.6. Стабильность

Стабильность вакцины следует подтверждать посредством тестирования продукта на иммуногенность с периодическими интервалами в течение датированного периода. В США тестируется не менее трех партий вакцины и конце датированного периода данные партии вакцины должны соответствовать установленным требованиям к иммуногенности. Вакцины обычно хранят при 2-7°C и защищают от замораживания. Частично использованные упаковки в конце рабочего дня выбрасывают.

С2. Живая вакцина

1. Общая информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование продукта

Живые вакцины, содержащие модифицированную *P. multocida*, обычно не применяются, исключение составляет Северная Америка. Живые вакцины обычно вводят с питьевой водой или в перепонку крыла. Следует избегать вакцинации больных птиц или птиц с плохой упитанностью, поскольку в таких случаях можно не получить удовлетворительного иммунного ответа.

2. Основные принципы производства и минимальные требования к вакцинам

Руководство по производству ветеринарных вакцин изложено в Главе 1.1.8.

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Все штаммы *P. multocida*, включаемые в вакцину, должны быть хорошо охарактеризованы, должны принадлежать к известному серотипу, должны быть чистыми, безопасными и иммуногенными. См. Главу 1.1.8., где изложены руководства по исходным посевным материалам.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от чужеродных агентов)

Посевной материал *Pasteurella multocida* должен представлять собой чистую культуру и быть свободным от посторонних бактерий и грибов.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Пригодность в качестве вакцинного штамма демонстрируется в тестах по определению эффективности и безопасности. Кроме того, посевные материалы, используемые для получения живых вакцин, должны быть генетически и фенотипически стабильны при повторном пассировании *in vivo*. В идеале, они не должны персистировать в вакцинированном животном, и любое выделение вакцинированными птицами вакцинного организма в среду должно быть ограниченным по объему и продолжительности.

2.1.4. Процедура, используемая в чрезвычайных обстоятельствах по временному утверждению нового исходного посевного вируса (MSV) в случае эпизоотии

Во многих странах имеются механизмы по проведению временного утверждения в случае эпизоотии, во время которой имеющиеся коммерческие вакцины не эффективны. Поскольку инактивированные вакцины против пастереллеза птиц обычно эффективны и представляют меньший риск в плане своей безопасности, то более вероятно, что инактивированная вакцина будет рассматриваться для использования во время эпизоотии пастереллеза птиц.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Приготовление производственных культур каждого бактериального изолята, предназначенного для включения в конечный продукт осуществляется отдельно. Культуры *Pasteurella multocida* могут быть выращены в подходящей среде в виде бульона или могут быть первоначально выращены на агаровой среде, а их наработка для увеличения объема может производиться на бульонной среде. Культуры субпассируют до получения желаемого объема. Сбор урожая культур производится, когда они достигают определенной плотности, которая часто определяется посредством спектрофотометрии (оптическая плотность).

Каждую компонентную культуру можно стандартизировать посредством концентрирования или разбавления, доведя до желаемой концентрации. Все стандартизированные компонентные культуры перемешивают перед фасовкой в стерильные конечные контейнеры. Живые вакцины обычно лиофилизируют, но непосредственно перед их использованием следует произвести их восстановление стерильным разбавителем.

2.2.2. Требования к ингредиентам

См. Главу 1.1.8.

2.2.3. Контроль в процессе производства

Чистоту культур определяют на каждом этапе производства. Это можно производить посредством микроскопического исследования (например, фазово-контрастная микроскопия, грам-окрашивание) или посредством культивирования. Во время изготовления необходимо строго контролировать производственные параметры, чтобы гарантировать, что все серии (партии) произведены таким же образом, какой был использован для производства серий, использованных для исследований на эффективность.

2.2.4. Тесты на партии готового продукта

i) Стерильность

Тесты на стерильность проводятся на фасованной вакцине. Каждая партия должна соответствовать требованиям к стерильности, например, таковым, подробно изложенным в 9 CFR, Часть 113.27 (CFR USDA, 2013). (См. также Главу 1.1.9).

ii) Чистота

Каждая партия должна пройти тест на чистоту, который проводится с использованием имеющихся в продаже сред и без учета роста вакцинной бактерии, например, как описано в 9 CFR, Часть 113.27 (CFR USDA, 2013). (См. также Главу 1.1.7).

iii) Идентичность

В США каждую партию живой вакцины тестируют на идентичность. Требования других стран могут варьировать. Такое тестирование обычно производится посредством характеризования бактерии *in vitro*.

iv) Безопасность

Живые вакцины можно тестировать в соответствии с методом, описанным в Разделе C1. 2.3.2.i., кроме того, что часто требуется использовать только один репрезентативный вид животных.

Определенные страны (например, ЕС), также могут требовать проведения тестирования каждой партии на содержание эндотоксина (European Pharmacopoeia, 2008).

v) Иммуногенность партии

Иммуногенность партий живой вакцины определяется подсчетом количества бактерий в восстановленном лиофилизированном продукте в его конечном контейнере. В США среднее количество бактерий в любой партии вакцины в момент приготовления должно быть достаточно высоким, чтобы гарантировать, что в любой период времени до истечения срока годности продукта, данное количество, как минимум, в два раза превышает стандарт

иммуногенности. В ЕС требуется, чтобы количество бактерий было, как минимум, равно стандарту иммуногенности.

v) Содержание влаги

Лиофилизированные вакцины тестируют на содержание влаги. Гармонизированные требования к тестированию на степень влажности гравиметрическим методом изложены в VICH GL26 (VICH, 2003). Обычно ожидается, что степень влажности должна быть менее 5%.

2.3. Требования к разрешению/регистрации/лицензированию

2.3.1. Процесс изготовления

См. Главу 1.1.6.

2.3.2. Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Оценку степени безопасности исходных посевных материалов, используемых в производстве живых вакцин, необходимо производить до лицензирования. Следует производить тестирование на безопасность на каждом виде животных (куры, индейки, утки, попугаи), для которых рекомендован продукт. Имеются гармонизированные требования VICH GL 44 (VICH, 2006) для определения безопасности для целевого вида животных.

Обычно для живых вакцин требуется проводить исследования с использованием избыточной дозы. Например, каждой из 10 птиц вводят объем продукта равный 10 дозам вакцины и наблюдают за ними в течение 10 дней. Если наблюдаются неблагоприятные реакции, данные факты следует включить в оценку риска и, возможно, будет целесообразно разработать требования к максимальной допустимой серийной иммуногенности.

Исходный посевной материал также тестируют на репрезентативных нецелевых видах животных (например, грызуны или нецелевые виды птиц), которые, как ожидается, могут контактировать с вакцинной бактерией, выделяемой вакцинированными птицами в среду. Бактерии, содержащиеся в исходном посевном материале, следует вводить наиболее восприимчивым видам животных в возрасте, когда они наиболее чувствительны к инфекции, путем (например, перорально), который, как ожидается, существует в полевых условиях.

ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин и по соображениям охраны окружающей среды

Исходные посевные бактерии для живых вакцин, следует оценивать на их стабильность посредством повторного пассирования *in vivo*. Посевной

материал после множественных пассажей должен оставаться авирулентным и генотипически стабильным. Гармонизированные требования по исследованиям возврата к вирулентности описаны в VICH GL 44 (VICH, 2006).

Посевные материалы для живых вакцин также следует тестировать на их потенциальное выделение в среду вакцинированными животными, персистенцию и распространение в окружающей среде. В идеале выделение вакцинных организмов в среду должно происходить в течение короткого периода, и они не должны персистировать в окружающей среде. Исключения из идеальных условий следует рассматривать при проведении оценки риска для конкретного продукта.

iii) Меры предосторожности (опасности)

В случае, если человек подвергается непреднамеренному воздействию вакцинного организма, следует обратиться к врачу-терапевту.

2.3.3. Требования к эффективности

Необходимо продемонстрировать, что продукты, полученные из кандидатных исходных посевных материалов, эффективно защищают от контрольного заражения. Необходимо продемонстрировать эффективность продукта для каждого вида животных (например, куры, индейки) и при введении каждым из путей, для которых она рекомендована. Следует продемонстрировать предоставление защиты от контрольного заражения каждым из серотипов, защита от которых заявлена. Птицы, используемые для исследования эффективности, должны быть иммунологически интактными в отношении пастереллеза птиц и минимального возраста, рекомендуемого для использования продукта. Партия продукта, используемого для демонстрации эффективности, должна быть произведена из исходного посевного материала наивысшего разрешенного пассажа.

Для живых вакцин против пастереллеза птиц в США в каждом исследовании эффективности используются 20 вакцинированных птиц и 10 контрольных птиц. Птиц контрольно заражают не ранее чем через 14 дней после вакцинации, и наблюдают за ними в течение 14 дней после контрольного заражения. Результаты теста считаются удовлетворительными если, как минимум, восемь контролей погибли и не менее 16 вакцинированных птиц остались в живых.

Среднее арифметическое количества колониеобразующих единиц в партии продукта, которая используется для демонстрации эффективности, используется как минимальный стандарт (стандарт иммуногенности) для всех последующих производственных партий вакцины.

2.3.4. Вакцины, позволяющие использовать DIVA стратегию (выявление инфекции у вакцинированных животных)

К данной болезни не применимо.

2.3.5. Продолжительность иммунитета

Формально проведения исследований с целью определения продолжительности иммунитета обычно не требуется, хотя важно проверять, каковы требования отдельных стран в этом отношении. Рекомендации по повторной вакцинации, кроме первичной серии вакцинации, чаще всего определяются практическим путем.

2.3.6. Стабильность

Стабильность вакцины следует подтверждать посредством тестирования продукта на иммуногенность с периодическими интервалами в течение датированного периода. В США тестирование партий вакцины производится до тех пор, пока не будут получены статистически достоверные данные о стабильности. Каждая партия должна соответствовать установленным требованиям к иммуногенности в конце датированного периода. Живые вакцины следует использовать сразу же после вскрытия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

CARTER G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida* . I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, 16, 481–484.

CARTER G.R. (1972). Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. *Appl. Microbiol.*, 24, 162–163.

DERIEUX W.T.(1978). Response of young chickens and turkeys to virulent and avirulent *Pasteurella multocida* administered by various routes. *Avian Dis.*, 22, 131–39.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2008). Vaccines for Veterinary Use. Fowl Cholera Vaccine Inactivated. 1945. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.

GLISSON J.R., HOFACRE C.L. & CHRISTENSEN J.P. (2013). In: Diseases of Poultry; Thirteenth Edition, Swayne D.E., Editor in Chief, Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V., Associate Editors. Wiley -Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, pp 807–823.

GLISSON J.R., SANDHU T.S., & HOFACRE C.L.(2008). Pasteurellosis, Avibacteriosis, Gallibacteriosis, Riemerellosis, and Pseudotuberculosis. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification, and Characterization of Avian Pathogens, Fifth Edition, Dufour- Zavala L., Swayne D.E., Glisson J.R., Pearson J.E., Reed W.M., Jackwood M.W. & Woolcock P.R., eds. American Association of Avian Pathologists, Athens, Georgia, USA, 12–14.

HARPER M., JOHN M., TURNI C., EDMUNDS M., ST MICHAEL F., ADLER B., BLACKALL P. J., COX A.D. & BOYCE J.D. (2015). Development of a rapid multiplex PCR to genotype *Pasteurella multocida* strains using the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J. Clin. Microbiol.*, 53(3), 477–485.

HEDDLESTON K.L. (1962). Studies on pasteurellosis. V. Two immunogenic types of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. *Avian Dis.*, 6, 315–321.

HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, 16, 925–936.

International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) (2003). Guideline 25: Testing of residual formaldehyde. http://www.vichsec.org/pdf/03_2003/GI25_st7.pdf

International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (2003). Guideline 26: Testing of residual moisture. http://www.vichsec.org/pdf/03_2003/GI26_st7.pdf

International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (2006). Guideline 40: Target Animal Safety – Examination of Live Veterinary Vaccines in Target Animals for Absence of Reversion to Virulence. <http://www.vichsec.org/pdf/0807/GL41-st7.pdf>

International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) (2009). Guideline 44: Target Animal Safety – Examination of Live Veterinary Vaccines in Target Animals for Absence of Reversion to Virulence. <http://www.vichsec.org/pdf/0807/GL41-st7.pdf>.

MIFLIN J.K. & BLACKALL P.J. (2001). Development of a 23s rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, (3), 216–221

RIMLER R.B. (1994). Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D, and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases. *Vet. Rec.*, 134, 191–192.

TOWNSEND K. M, BOYCE J. D., CHUNG J.Y., FROST A. J. & ADLER B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 39 (3) 924–929. Erratum in: *J. Clin. Microbiol.*, (2001), 39 (6), 2378

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2013). Code of Federal Regulations, Title 9, Animals and Animal Products. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.

WILSON M.A., RIMLER R.B. & HOFFMAN L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroups B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 1518–1524.

* *
*