

НОДУЛЯРНЫЙ ДЕРМАТИТ

РЕЗЮМЕ

Описание болезни: Нодулярный дерматит (LSD, knopvelsiekte) – оспа КРС, которая характеризуется жаром, появлением бугорков на коже, слизистых мембранах и внутренних органах, истощением, увеличением лимфатических узлов, отеком кожи, а иногда смертью. Болезнь является значимой с точки зрения экономики, поскольку она может вызвать временное снижение производства молока, временную или постоянную стерильность быков, повреждения шкуры, а также смерть по причине вторичных бактериальных инфекций. За болезнь отвечают различные штаммы каприпоксвируса. Они антигенно не отличаются от штаммов, вызывающих овечью оспу и оспу коз, но все же отличаются на генетическом уровне. Нодулярный дерматит имеет немного отличное от оспы овец и коз географическое распространение, что говорит о том, что штаммы каприпоксвируса КРС не инфицируют и не передаются между овцами и козами. Считается, что передача нодулярного дерматита осуществляется преимущественно насекомыми. Передача путем естественного контакта при отсутствии инфицированных насекомых-векторов маловероятна. Нодулярный дерматит является эндемичной болезнью в большинстве Африканских стран и стран Ближнего Востока. В 2015 и 2016 годах болезнь распространилась на юго-востоке Европы, Балканах и Кавказе.

Патология: нодулы твердые, могут достигать до подкожного слоя и мышц. Основные острые гистологические поражения заключаются в эпидермальных вакуолярных изменениях с внутрицитоплазматическими включениями и дермальным васкулитом. Основные гистологические изменения, свидетельствующие о хронической форме, представляют собой фиброз и некротические сиквестры.

Идентификация возбудителя: Лабораторное подтверждение нодулярного дерматита быстрее всего произвести с помощью традиционной полимеразной цепной реакции (ПЦР) или ПЦР в реальном времени (ПЦР), т.е. метода, специфичного для каприпоксвируса, в сочетании с клинической историей генерализованной формы нодулярного дерматита, а также увеличенными поверхностными лимфатическими узлами у КРС. На ультраструктурном уровне вирионы каприпоксвируса отличаются от вирионов парапоксвируса, которые вызывают папулезный стоматит бычьих и ложную коровью оспу, однако морфологически они не отличаются от вирионов ортопоксвируса, включая вирус коровьей оспы и вирус осповакцины, которые могут вызывать болезнь КРС. Ни одна из данных вирусов, тем не менее, не вызывает генерализованную форму инфекции, и оба не характерны для КРС. Вирус нодулярного дерматита растет в культуре тканей бычьих, овечьих или козьих, хотя максимальный урожай получают, используя клетки семенников ягнят или дермы бычьих. В культуре клеток вирус нодулярного дерматита вызывает характерный цитопатогенный эффект и внутрицитоплазматические включения, что отличается от инфекции герпесвирусом 2 бычьих, который вызывает псевдо нодулярный дерматит и продуцирует синцитии и внутридермные тельца-

включения в культуре клеток. Антигены каприпоксвируса можно обнаружить в культуре ткани с помощью иммунопероксидазного или иммунофлюоресцентного окрашивания, а вирус можно нейтрализовать с помощью специфической антисыворотки.

Известно о ряде традиционных ПЦР и ПЦР в реальном времени, а также изотермической амплификации с использованием капсипроксвирус-специфических праймеров, проведенных с использованием различных образцов.

Серологические тесты: Реакция вирус нейтрализации – единственный валидированный тест. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле и реакция непрямой иммунофлюоресценции являются менее специфичными по сравнению с реакцией вирус нейтрализации по причине перекрестной реакции с антителами к другим поксвирусам. Вестерн блоттинг с использованием реакции между P32 антигеном вируса нодулярного дерматита и тестовой сыворотки является и чувствительным, и специфичным, но его сложно и дорого проводить. Для обнаружения антител было описано несколько ферментных иммуносорбентных анализов (ИФА), однако ни один из них не валидирован в достаточной степени, чтобы быть рекомендованным к использованию.

Требования к вакцинам: Все изученные до сих пор штаммы каприпоксвируса, полученные от КРС, овец или коз, являются антигенно схожими. В качестве живой вакцины против вируса нодулярного дерматита используют аттенуированные штаммы КРС и штаммы, полученные от овец и коз.

А. ВВЕДЕНИЕ

Нодулярный дерматит (LSD) впервые обнаружили в Замбии в 1929 году, затем он распространился в Ботсвану к 1943 году (Haig, 1957), а потом в Южную Африку, где поразил более восьми миллионов КРС, что привело к большим экономическим потерям. В 1957 году он проник в Кению, где был связан со вспышкой оспы овец (Weiss, 1968). Нодулярный дерматит распространился к северу, в Судан, а к 1974 году – на запад, в Нигерию, и в 1977 году о нем сообщали в Мавритании, Мали, Гане и Либерии. Другая эпизоотия нодулярного дерматита произошла между 1981 и 1986 и поразила Танзанию, Кению, Зимбабве, Сомали и Камерун, при этом смертность пораженного КРС составляла 20%. Появление нодулярного дерматита к северу от пустыни Сахара и за пределами африканского континента впервые было подтверждено в Египте и Израиле между 1988 и 1989 гг., затем о нем вновь сообщили в 2006 году (Brenner *et al.*, 2006). За последние десять лет о вспышках нодулярного дерматита сообщали на Ближнем Востоке, в европейском и западно-азиатском регионах (МЭБ, 2016 г.). Вспышки нодулярного дерматита носят спорадический характер, зависят от перемещения животных, их иммунного статуса, а также от ветровых и дождевых режимов, которые влияют на векторы. Считается, что основной метод передачи – механический, т.е. членистоногими переносчиками (Turpirainen *et al.*, 2015).

Степень тяжести клинических признаков нодулярного дерматита зависит от штамма каприпоксвируса, от возраста, иммунологического статуса и от породы хозяина. *Bos taurus* более восприимчив к клинической болезни, чем *Bos indicus*; сообщалось, что азиатский буйвол также восприимчив. В пределах *Bos Taurus* у тонкокожих пород коров молочного направления с повышенной жирностью молока (Channel Island) болезнь имеет высокую степень тяжести, при этом лактирующие самки подвергаются наибольшему риску. Однако, даже в группе КРС одной породы, содержащихся вместе в одних условиях, клинические признаки сильно варьируют от субклинической инфекции до наступления смерти (Carn & Kithching, 1995). Вирус может и не заразить всю группу, что, возможно, зависит от вирулентности изолята вируса, иммунного статуса и генотипа хозяина, а также превалентности вектора.

Не было сообщений об инкубационном периоде в полевых условиях, но после инокуляции до начала лихорадки проходит 6-9 дней. У тяжело инфицированных животных может быть первичная лихорадка, при которой температура может достигать 41⁰С, и которая может персистировать в течение недели. Все поверхностные лимфатические узлы увеличиваются. У лактирующих самок заметно снижается удой молока. Между 7 и 19 днем после инокуляции вирусом на теле появляются поражения, в частности на голове, шее, вымени, скротуме, вульве и в промежности (Coetzer, 2004). Наблюдаются множественные покровные поражения, которые в совокупности достигают 0,5-5 см в диаметре и представляют собой твердые, плоские папулы и нодулы. Такие нодулы затрагивают дерму и эпидермис и могут доходить до подкожного слоя, а также иногда до прилегающих поперечно-полосатых мышц. В разрезе нодулы от кремово-серого до белого цвета, изначально они могут выделять сыворотку, но через последующие 2 недели в нодуле может появиться шишковидное ядро или секвестр некротического материала/некротическая пробка. Острые гистологические поражения представляют

собой эпидермальные вакуолярные изменения с внутрицитоплазматическими включениями и дермальным васкулитом. Включения множественны, внутрицитоплазматические, эозинофильные, гомогенные или иногда зернистые и могут появляться в эндотелиальных клетках, фибробластах, макрофагах, перичитах и кератиноцитах. Дермальные поражения включают васкулит с фибриноидным некрозом, отеку, тромбоз, лимфангит, дермальные и эпидермальные отделения, смешанный воспалительный инфильтрат. Хронические поражения характеризуются нарушением ткани с отделением некротического ядра, которое часто окружено грануляционной тканью, которая постепенно сменяется зрелым фиброзом. При появлении клинических признаков выделения из глаз и носа становятся слизисто-гнойными, и может развиваться кератит. Нодулы могут также образоваться на слизистых мембранах ротовой полости и пищеварительного тракта, особенно в сычуге, трахеях и легких, что приводит к возникновению первичной или вторичной пневмонии. Нодулы на слизистых мембранах глаз, носа, ротовой полости, прямой кишки, вымени и гениталиях быстро покрываются язвами. К этому моменту во всех секретах, выделениях из глаз и носа, а также в слюне содержится вирус нодулярного дерматита. Лимфатические узлы могут сильно опухнуть, и животное будет двигаться неохотно. Беременные самки могут abortировать, и регистрировались случаи внутриутробной передачи (Rouby & Aboulsoudb, 2016). Быки могут стать временно или постоянно инфертильными, и вирус может еще долгое время выделяться со спермой (Irons et al., 2005). Выздоровление от тяжелой формы инфекции занимает долгое время; животное может быть истощено, у него может быть пневмония и мастит, а также некротические пробки кожи, которые могли быть подвержены заражению мушиными яйцами, и которые, отпадая, оставляют глубокие рытвины на шкуре (Prozesky & Bernard, 1982).

Основная дифференциальная диагностика – псевдо нодулярный дерматит, вызываемый герпесвирусом бычьих 2 типа (BoHV-2). Обычно клинические признаки мягче, характеризуются поверхностными нодулами, напоминающими нодулярный дерматит на ранней стадии. Внутриядерные тельца-включения и образование синцитиев являются гистопатологическими характеристиками инфекции герпесвирусом бычьих 2 типа, которые не наблюдаются при нодулярном дерматите. Другие дифференциальные диагностики (для покровных поражений) включают: дерматофилез, дерматофитоз, кожный сап, фотосенсибилизацию, актиномикоз, уртикарию, укусы насекомых, бесноитиоз, нокардиоз, демодекоз, онхоцеркоз, псевдо коровью оспу и коровью оспу. Дифференциальные диагностики для поражений слизистых включают: ящур, блютанг, вирусную диарею КРС, злокачественную катаральную лихорадку, инфекционный ринотрахеит КРС и папулезный стоматит КРС.

Вирус нодулярного дерматита не передается человеку. Тем не менее, работа в лаборатории должна проводиться в соответствующих условиях биобезопасности, которые определяются в ходе анализа рисков (смотрите Главу 1.1.4 *Биозащита и биобезопасность: Стандарт по управлению биологическими рисками в ветеринарных лабораториях и вивариях*).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы тестирования для диагностики нодулярного дерматита и их цель

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции перед его перемещением	Вклад в политику по искоренению	Подтверждение клинических случаев у животных	Превалентность инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяции и после вакцинации
Идентификация возбудителя						
Выделение вируса	+	++	+	+++	+	-
ПЦР	++	+++	++	+++	+	-
Электронная микроскопия	-	-	-	+	-	-
Обнаружение иммунного ответа						
ВН	++	++	++	++	++	++
Непрямой метод РИФ	+	+	+	+	+	+

Разъяснение: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может быть использован в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели; н/п = не применим.

Несмотря на то, что не все тесты в категории +++ или ++ прошли формальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что их широко используют, а результаты не вызывают сомнений, делает их допустимыми.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; ВН = вирус нейтрализация; Непрямой метод РИФ = непрямой метод реакции иммунофлюоресценции.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Отбор, представление и подготовка образцов

Материал для выделения вируса и обнаружения антигена необходимо отобрать с помощью биопсии или при патологоанатомическом исследовании из нодул на коже. Образцы для выделения вируса желательнее отобрать в течение первой недели после появления клинических признаков, до образования нейтрализующих антител (Davies, 1991; Davies *et al.*, 1971), однако вирус можно выделить из нодул в течение 3-4 недель. Образцы для обнаружения генома путем традиционной полимеразной цепной реакции (ПЦР) или ПЦР в реальном времени можно отобрать и при наличии нейтрализующих антител. После появления первых поражений кожи вирус можно выделить в течение 35 дней, а вирусную нуклеиновую кислоту можно обнаружить с помощью ПЦР в течение 3 месяцев (Turpurainen *et al.*, 2005; Weiss, 1968). Для выделения вируса можно также

использовать лейкоцитную плёнку из крови, собранной в гепарин или этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТК) во время веримической стадии нодулярного дерматита (до генерализации поражений или в течение 4 дней после генерализации). Образцы для гистологии должны включать ткань из прилегающей зоны, их размер должен составлять максимум 2 см³, и сразу же после отбора их необходимо поместить в десятикратный объем образца 10%-ого раствора забуференного нейтрального формалина.

В отношении ткани в формалине нет никаких специальных требований по транспортировке. Образцы крови с антикоагулянтом для выделения вируса из лейкоцитной плёнки необходимо быстро поместить на лед и обработать как можно скорее. Фактически, образцы можно хранить при температуре 4°C до 2 дней до переработки, но их нельзя замораживать или хранить при комнатной температуре. Ткани для выделения вируса и обнаружения антигена необходимо хранить при температуре 4°C, на льду или при температуре -20°C. Если образцы нужно транспортировать на длинные дистанции без холодильников, среда должна содержать 10%-ый глицерол; образцы должны быть достаточными по размеру (т.е. 1 г на 10 мл), чтобы транспортировочная среда не проникла в центральную часть материала биопсии, который будет использоваться для выделения вируса.

Материал для гистологии необходимо приготовить с помощью одного из стандартных методов и окрасить гематоксилином и эозином (H&E) (Burdin, 1959). Материал поражений для выделения вируса и обнаружения антигена сначала измельчают стерильным скальпелем и щипцами, а затем в стерильном миксере с шариковым подшипником или растирают пестиком в стерильной ступке со стерильным песком и равным по объему стерильным фосфатно-буферным раствором (ФБР) или модифицированной средой Игла без сыворотки, содержащими пенициллин натрия (1000 международных единиц [МЕ/мл]), стрептомицина сульфат (1мг/мл), микостатин (100 МЕ/мл) или фунгизон (амфотерицин 2,5 µг/мл) и неомицин (200МЕ/мл). Суспензию трехкратно подвергают замораживанию-оттаиванию, а затем частично очищают путем центрифугирования в настольной центрифуге при 600 g в течение 10 минут. В случае, когда возможна бактериальная контаминация образца (например, когда вирус выделен из образцов кожи) надосадочную жидкость можно профильтровать с помощью 0,45µм фильтра после стадии центрифугирования. Лейкоцитарную пленку можно приготовить из не свернувшейся крови путем центрифугирования при 600 g в течение 15 минут, и лейкоцитарную пленку аккуратно перенести в 5 мл холодной бидистиллированной воды, используя стерильную пастеровскую пипетку. Через 30 секунд добавляют 5 мл холодной ростовой среды двойной концентрации и перемешивают. Смесь центрифугируют при 600 g в течение 15 минут, удаляют надосадочную жидкость, и суспендируют сгусток клеток в 5мл ростовой среды, такой как модифицированная по способу Глазго среда Игла (GMEM). После центрифугирования при 600 g в течение последующих 15 минут, полученный сгусток суспендируют в 5 мл свежей модифицированной по способу Глазго среде Игла. В качестве альтернативы лейкоцитарную пленку можно отделить от образца в гепарине с помощью градиента Ficoll.

1.2. Выделение вируса на культуре клеток

Вирус нодулярного дерматита растет в культуре ткани бычьего, овечьего или козьего происхождения, хотя первичная или вторичная культура клеток дермы бычьих или клеток семенников ягнят считается наиболее чувствительной. Один мл очищенной надосадочной жидкости или лейкоцитарной пленки инокулируют в слившийся монослой в колбе для культивирования объемом 25 см² при температуре 37°C и оставляют для абсорбции на 1 час. Затем культуру промывают теплым ФБР и покрывают 10 мл подходящей среды, такой как модифицированная по способу Глазго среда Игла, в которой содержатся антибиотики и 2%-ая фетальная телячья сыворотка. При наличии, также инфицируют пробирки для культивирования ткани, в которых содержатся LT клетки и имеется покровное стекло, или предметное стекло с культурой ткани.

Колбы проверяют ежедневно в течение 7-14 дней на наличие цитопатического эффекта (CPE). В инфицированных клетках наблюдается характерный цитопатический эффект, который заключается в отодвигании клеточной мембраны от окружающих клеток, и, в конечном счёте, в округлении клеток и скоплении ядерного хроматина. Поначалу можно увидеть только небольшой участок цитопатического эффекта, иногда уже через 2 дня после инфицирования; через последующие 4-6 дней данный участок увеличивается и включает весь клеточный пласт. Если цитопатический эффект не наблюдается на 14 день – культуру необходимо трижды подвергнуть замораживанию-оттаиванию, и очищенную надосадочную жидкость инокулировать на свежую культуру LT. При первом проявлении цитопатического эффекта в колбах или ранее, если использовались инфицированные покровные стекла, необходимо снять покровное стекло, зафиксировать в ацетоне и окрасить с помощью Н&Е. Эозинофильные внутрицитоплазматические включения, которые отличаются по размеру, но составляют до половины размера ядра, и окруженные светлым ореолом, являются диагностическими для инфекции поксвирусом. В качестве альтернативы Н&Е для подтверждения диагноза можно провести ПЦР. Цитопатический эффект можно предотвратить или отсрочить путем включения в среду специфической сыворотки против нодулярного дерматита. Напротив, герпесвирус, который вызывает псевдонодулярный дерматит, продуцирует тельца Коудри типа А. Образование синцитий обычно не характерно для инфекции каприпоксвирусом (хотя их можно увидеть в клетках Мадин-Дарби почек бычьих [MDBK]).

Штаммы каприпоксвируса, вызывающие нодулярный дерматит, были адаптированы для выращивания на хориоаллантоисной мембране куриных яиц с эмбрионами и в клетках почек зелёной мартышки (Vero). Это не рекомендуется для первичного выделения. Вторичные линии клеток семенников овечьих (ОАЗ. Ts) были оценены с точки зрения размножения изолятов каприпоксвируса (Babuik *et al.*, 2007).

1.3. Электронная микроскопия

Характерные вирионы поксвируса можно визуализировать методом негативного окрашивания с последующим исследованием под электронным микроскопом. Существует большое количество протоколов для проведения негативного окрашивания, ниже приведен пример.

Перед центрифугированием материал из первоначальной биопсийной суспензии готовят для изучения под просвечивающим электронным микроскопом путем поддержания шестигранной решетки с 400 отверстиями для электронного микроскопа с помощью углеродного субстрата Pioloform, активированного тлеющим разрядом в парах пентиламина, на капле суспензии, помещенной на парафильм или восковую пластинку. Через 1 минуту решетку переносят на каплю Tris/EDTA буфера, pH 7.8, на 20 секунд, а затем на каплю 1% фосфорновольфрамовой кислоты, pH 7.2, на 10 секунд. Решетку дренируют с помощью фильтровальной бумаги, высушивают и помещают на электронный микроскоп. Вирион каприпоксвируса имеет форму кирпича, он покрыт короткими цилиндрическими элементами и его размер приблизительно составляет 290 × 270 нм. Мембрана, полученная из клетки хозяина, может окружать некоторые из вирионов. Необходимо исследовать как можно больше вирионов, чтобы подтвердить их наличие (Kithching & Smale, 1986).

Вирионы каприпоксвируса не отличаются от вирионов ортопоксвируса, но кроме вируса осповакцины и вируса коровьей оспы, которые не типичны для КРС и не вызывают генерализованную форму инфекции, ни один из других ортопоксвирусов не вызывает поражения у КРС. Однако вирус осповакцины может вызвать генерализованную форму инфекции у молодых телят со слабым иммунитетом. Напротив, ортопоксвирусы являются типичной причиной болезни кожи у домашних буйволов, вызывая оспу буйволов, болезнь, которая обычно проявляется в виде оспин на сосках, но поражения кожи могут также появляться на других участках, таких как промежность, средняя часть бедра и голова. Ортопоксвирусы, которые вызывают оспу буйволов не просто отличить от каприпоксвируса с помощью электронной микроскопии. Вирионы парапоксвируса, которые вызывают папулезный стоматит бычьих и ложную коровью оспу, меньше, овальные по форме, и каждый из них покрыт одним непрерывным цилиндрическим элементом, который выглядят, как полоски над вирионами. Каприпоксвирус также отличается от герпесвируса, который вызывает псевдонодулярный дерматит (Allerton – herpes mammillitis).

1.4. Реакция иммунофлюоресценции

Антиген каприпоксвируса можно также идентифицировать на инфицированных покровных стеклах или предметных стеклах с культурой ткани с помощью реакции иммунофлюоресценции. Покровные стекла или предметные стекла необходимо промыть, высушить и зафиксировать в холодном ацетоне в течение 10 минут. Непрямой тест с использованием иммунной сыворотки КРС подвергают сильному фону и неспецифическим реакциям. Однако непосредственно конъюгат можно приготовить из сыворотки, полученной от переболевших особей КРС (или от овец или коз, переболевших вирусом каприпокс). Неинфицированную культуру ткани необходимо включить как отрицательный контроль, поскольку перекрестные реакции могут вызвать проблемы по причине наличия антител к клеточным компонентам.

1.5. Иммуногистохимия

Имеется описание проведения иммуногистохимии с использованием F80G5 моноклонального антитела, специфичного для каприпоксвируса ORF 057, для

обнаружения антигена вируса нодулярного дерматита в коже экспериментально инфицированного КРС (Vabiuk et al., 2008).

1.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Традиционный метод ПЦР на основе геля, описанный ниже, это простой, быстрый и чувствительный метод обнаружения генома каприпоксвируса в крови с ЭДТА, биопсии, сперме и образцах культуры ткани. Совсем недавно были описаны количественные методы ПЦР в реальном времени, и сообщается, что они быстрее и их чувствительность выше (Bowden *et al.*, 2008; Balinsky *et al.*, 2008). Опубликован метод ПЦР в реальном времени, который дифференцирует вирус нодулярного дерматита, вирус оспы овец и вирус оспы коз (Lamien *et al.*, 2011).

Пример опубликованного традиционного метода ПЦР на основе геля описан ниже (Turpurainen *et al.*, 2005).

1.6.1. Процедура тестирования

Метод экстрагирования, описанный ниже, можно заменить коммерчески доступными наборами для экстрагирования ДНК.

- i) 200µл крови в ЭДТК, спермы или надосадочной жидкости культуры ткани замораживают и оттаивают, суспендируют в 100 µл лизирующего буфера, в котором содержится 5 М гуанидинтиоцианата, 50 мМ калия хлорида, 10 мМ Tris/HCl (pH 8); и 0,5 мл Твин 20.
- ii) Кожу или другие образцы ткани режут на кусочки с помощью стерильного скальпеля и щипцов. Растирают пестиком в ступке. Образцы ткани суспендируют в 800µл упомянутого выше лизирующего буфера.
- iii) Добавляют 2µл протеиназы К (20 мг/мл) к образцам крови и 10 µл протеиназы К к образцам ткани. Инкубируют при температуре 56°C в течение 2 часов или в течение ночи, после чего нагревают при температуре 100°C в течение 10 минут. Добавляют фенол: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1 [o/o]) к образцам в соотношении 1:1. Перемешивают на вортексе и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут. Образцы центрифугируют при 16060 g в течение 15 минут при температуре 4°C. Аккуратно собирают верхнюю водную фазу (до 200µм) и переносят в чистую колбу объемом 2,0 мл. Добавляют два объема холодного этанола (100%) и 1/10 3 М ацетата натрия (pH 5,3). Образцы помещают в температуру -20°C на 1 час. Снова центрифугируют при 16060 g в течение 15 минут при температуре 4°C и удаляют надосадочную жидкость. Пеллеты промывают ледяным 70% этанолом (100µл) и центрифугируют при 16060 g в течение 1 минуты при 4°C. Надосадочную жидкость сливают и тщательно высушивают пеллеты. Пеллеты суспендируют в 30 µл воды, свободной от нуклеазы, хранят при температуре -20°C (Turpurainen *et al.*, 2005).

- iv) Из гена, кодирующего вирусный белок присоединения, разработали праймеры. Размер ожидаемого ампликона составляет 192 п.о. (Ireland & Vinopal, 1998). Праймеры имеют следующие последовательности генов:

Прямой праймер 5'-TCC-GAG-CTC-TTT-CCT-GAT-TTT-TCT-TAC-TAT-3'

Обратный праймер 5'-TAT-GGT-ACC-TAA-ATT-ATA-TAC-GTA-AAT-AAC-3'.

- v) Амплификацию ДНК проводят в конечном объеме 50μл, содержащем: 5 μл 10× буфер ПЦР, 1.5 μл MgCl₂ (50мМ), 1 μл дНТФ (10 мМ), 1 μл прямого праймера, 1 μл обратного праймера, 1 μл матрицы ДНК (~10 нг), 0.5 μл полимеразы ДНК Taq и 39 μл свободной от нуклеазы воды. Требуемый объем матрицы ДНК может варьировать, и объем свободной от нуклеазы воды необходимо привести к конечному объему 50 μл.
- vi) Образцы обрабатывают в термоциклере: 2 минуты при 95°C; 45 секунд при 95°C, 50 секунд при 50°C и 1 минуту при 72°C (34 цикла); 2 минуты при 72°C и держат при температуре 4 °C до проведения анализа.
- vii) 10 μл каждого образца смешивают с загрузочной краской и загружают в 1,5% агарозный гель в буфер TAE (tris/ ацетатный буфер, содержащий ЭДТК). Параллельной линией загружают ДНК-маркерный лэддер, состоящий из 100 п.о. Электрофоретически продукты разделяют примерно на 8-10 V/cm на 40-60 минут и визуализируют с помощью подходящего красителя ДНК.

1.7. Изотермальная геномная амплификация

Сообщается, что молекулярное исследование с помощью петлевой изотермальной амплификации для обнаружения геномов каприпоксвируса имеет схожую с ПЦР в реальном времени чувствительность и специфичность, при этом метод является более простым и менее затратным (Das *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2013). О валидации в полевых условиях, проведенной Das *et al.*, сообщил Omoga *et al.* (2016).

2. Серологические тесты

У всех вирусов рода *Capripoxvirus* есть общий основной антиген, нейтрализующий антитела, и поэтому невозможно различить штаммы каприпоксвируса КРС, овец и коз, используя серологические методы.

2.1. Реакция вируснейтрализации

Тестовую сыворотку можно титровать против постоянного титра каприпоксвируса (100 ЦПД₅₀ [50% инфекционная доза культуры клеток]) или можно титровать стандартный штамм вируса против постоянного разведения тестовой сыворотки, чтобы вычислить индекс нейтрализации. По причине вариабельной чувствительности культуры ткани к каприпоксвирусу, а также сложности обеспечения использования 100 ЦПД₅₀, индекс нейтрализации является предпочтительным методом, несмотря на то, что для него требуется больший объем тестовой сыворотки. Тест проводят с помощью 96-луночных титрационных микропланшетов с плоским дном для культуры тканей, но его можно так же эффективно провести в культуральных пробирках, с соответствующими

изменениями в объемах, хотя считать значение конечной точки в пробирках сложнее. Сообщалось, что использование слеток Vero в реакции вируснейтрализации дает более достоверные результаты.

2.1.1. Процедура тестирования

i) Тестовую сыворотку, включая отрицательные и положительные контроли, разводят 1/5 в среде Игла/HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин, N-2-этансульфоновая кислота) и инактивируют при температуре 56°C в течение 30 минут.

ii) Затем 50μл первично инактивированной сыворотки добавляют в колонки 1 и 2, рядов А-Н титрационного микропланшета. Вторичную сыворотку помещают в колонки 3 и 4, третичную – в колонки 5 и 6, положительную контрольную сыворотку помещают в колонки 7 и 8, отрицательную контрольную сыворотку – в колонки 9 и 10, а 50 μл среды Игла/HEPES без сыворотки помещают в колонки 11 и 12, а также во все лунки ряда Н.

iii) Референтный штамм каприпоксвируса, обычно вакцинный штамм, который хорошо растет в культуре ткани, с титром выше $\log_{10} 6$ ЦПД₅₀ разводят в среде Игла/HEPES во флаконе, чтобы серия рабочих разведений имела $\log_{10} 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5$ ЦПД₅₀ на мл (эквивалентно $\log_{10} 3,7; 2,7; 2,2; 1,7; 1,2; 0,7; 0,2$ ЦПД₅₀ на 50μл).

iv) Начиная с ряда G и наиболее разведенного вирусного препарата, 50μл вируса добавляют в каждую лунку этого ряда. Данную процедуру повторяют с каждым разведением вируса, а разведение вируса с наивысшим титром помещают в ряд А.

v) Планшеты покрывают и инкубируют в течение 1 часа при 37°C.

vi) Клетки LT готовят из заранее выращенных монослоев как суспензию 10^5 клеток/мл в среде Игла, которая содержит антибиотики и 2% фетальную сыворотку телят. После инкубации титрационных микропланшетов во все лунки добавляют 100 μл суспензии клеток, кроме лунок Н11 и Н12, которые служат контрольными лунками для среды. Оставшиеся лунки ряда Н служат контролем клеток и сывороток.

vii) Титрационные микропланшеты сенсibiliзируют и инкубируют при температуре 37°C в течение 9 дней.

viii) Начиная с 4 дня, монослои ежедневно исследуют на наличие ЦПД с помощью инверсионного микроскопа. В ряде Н не должно быть ЦПД. На 9 день с помощью вакцинного штамма каприпоксвируса 0240KSGP производят итоговое считывание, и титр вируса в каждой титрации из двух повторностей подсчитывают методом Kärber. Если сделать это позднее - происходит “прорыв” вируса, при котором вирус, который был сначала нейтрализован, отделяется от антитела.

ix) *Интерпретация результатов*: индекс нейтрализации – это разница между значениями log титра вируса в отрицательной сыворотке и тестовой сыворотки. Индекс $\geq 1,5$ – положительный. Тест можно сделать более чувствительным, если сыворотку от одного и того же животного проверить до и после инфекции. Поскольку иммунитет к каприпоксвирусу является преимущественно опосредованным клетками, отрицательный результат, особенно после вакцинации, при которой ответ может быть слабым, не говорит о том, что животное, от которого была получена сыворотка, не защищено.

Описан метод постоянной вирус/вариабельная сыворотка, при котором используются разведения сыворотки в диапазоне от 1/5 до 1/500 и фетальные мышечные клетки телят. Поскольку данные клетки имеют более низкую чувствительность к каприпоксвирусу, по сравнению с LT клетками, решается проблема “прорыва” вируса.

Антитела к каприпоксвирусу можно обнаружить, начиная со 2 дня после начала клинических признаков. Их можно обнаружить в течение 7 месяцев, но значительный рост титров происходит обычно между 21 и 42 днем.

2.2. Иммунодиффузия в агаровом геле

Реакцию иммунодиффузии в агаровом геле не рекомендуют в качестве серологического теста для диагностики нодулярного дерматита, поскольку она вступает в перекрестную реакцию с антителами к папулезному стоматиту КРС и псевдопоксвирусу. Последствием такой перекрестной реактивности является получение ложноположительных результатов. Недостаточная чувствительность реакции может также привести к получению ложноотрицательных результатов.

2.3. Непрямая реакция флуоресцирующих антител

Инфицированную каприпоксвирусом культуру ткани, выращенную на покровных стеклах или предметных стеклах для культуры ткани, можно использовать для проведения непрямой реакции флуоресцирующих антител. В тест должны быть также включены не инфицированный контроль культуры ткани и положительная и отрицательная контрольные сыворотки. Инфицированную и контрольную культуры фиксируют в ацетоне при -20°C на 10 минут и хранят при 4°C . В ФБР делают разведения тестовых сывороток, начиная от 1/20 или 1/40, а положительные сыворотки идентифицируют, используя антибычий гамма-глобулин, конъюгированный с флуоресцинизиотиоцианатом. Титры антител после инфицирования могут превышать 1/1000. Сыворотки можно скринировать при 1/50 и 1/500. Перекрестные реакции могут возникнуть с контагиозным пустулезным дерматитом (вирусом контагиозного пустулезного дерматита овец), папулезным стоматитом КРС и, возможно, с другими поксвирусами.

2.4. Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг тестовых сывороток против инфицированного каприпоксвирусом клеточного лизата дает чувствительную и специфическую

систему для обнаружения антитела к структурным белкам каприпоксвируса, однако тест является дорогостоящим и сложным для проведения.

LT клетки, инфицированные каприпоксвирусом, необходимо собрать, когда ЦПЭ составляет 90%, трижды подвергнуть замораживанию-оттаиванию, и провести центрифугирование, чтобы продукты клеточного распада выпали в осадок. Надосадочную жидкость необходимо слить, а белки отделить с помощью SDS/PAGE (натрий додецилсульфат/полиакриламидный гель-электрофорез). С глициновым подвижным буфером, содержащим Tris (250 мМ), глицин (2 М) и натрий додецилсульфат (0,1%) рекомендуется использовать вертикальную систему прерывистых гелей, которая работает на концентрирующем геле, сделанном из акриламида 5% в Tris (125 мМ), рН 6.8, и натрия додецилсульфата (0,1%), а также разделяющем геле, сделанном из акриламида (10-12,5%) в Tris (560 мМ), рН 8.7, и натрия додецилсульфата (0,1%). До загрузки образцы надосадочной жидкости необходимо приготовить путем кипячения в течение 5 минут с соответствующим лизирующим буфером. В качестве альтернативы, очищенный вирус или рекомбинантные антигены могут заменить антиген, полученный из культуры ткани.

Маркеры молекулярного веса необходимо центрифугировать вместе с образцами белков. Отделенные в SDS/PAGE геле белки необходимо перенести с помощью электрофореза на нитроцеллюлозную мембрану (NCM). После перенесения нитроцеллюлозную мембрану тщательно ополаскивают в ФБР и блокируют в 3%-м альбумине бычьей сыворотки (BSA) в ФБР или в 5%-м сухом обезжиренном молоке в ФБР, в ротационном шейкере при температуре 4°C в течение ночи. Нитроцеллюлозную мембрану можно затем разделить на полоски с помощью коммерческого аппарата для одновременного тестирования большого количества образцов сыворотки, или же разделить на полоски и затем инкубировать каждую полоску по отдельности. Нитроцеллюлозную мембрану тщательно промывают, меняя пять раз ФБР, в течение 5 минут на ротационном шейкере, а затем инкубируют при комнатной температуре в шейкере в течение 1,5 часов с соответствующей сывороткой в разведении 1/50 в блокирующем буфере (3%-й альбумин бычьей сыворотки и 0,05% Tween 20 в ФБР; или 5%-ое сухое молоко и 0,05% Tween 20 в ФБР). Мембрану снова тщательно промывают и инкубируют (в блокирующем буфере) с антивидовым иммуноглобулином, конъюгированным пероксидазой хрена, в разведении, установленном путем титрации. После последующего инкубирования при комнатной температуре в течение 1,5 часов мембрану промывают и добавляют раствор диаминобензидин тетрагидрохлорида (10 мг в 50 мл 50мм Tris/HCl, рН 7.5, и 20μл 30% [o/o] перекиси водорода). Затем проводят инкубирование примерно в течение 3-7 минут при комнатной температуре в шейкере при постоянном наблюдении, потом реакцию останавливают путем промывания в ФБР прежде, чем проявится цвет фона. Для каждого случая необходимо использовать положительную и отрицательную контрольную сыворотку.

Положительные тестовые образцы и положительные контроли продуцируют паттерн, соответствующий реакции на белки, молекулярный вес которых составляет 67, 32, 26, 19 и 17 кДа – основные структурные белки каприпоксвируса – в то время как отрицательные образцы сыворотки не будут вступать в реакцию с этими паттернами. Гипериммунная сыворотка, приготовленная против парапоксвируса (папулёзного стоматита КРС или ложной коровьей оспы) будет вступать реакцию с некоторыми белками каприпоксвируса, но не с 32 кДа белком, который является специфическим для каприпоксвируса.

2.5. Твердофазный иммуноферментный анализ

В настоящее время предпринимаются попытки разработки и валидации твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антител к каприпоксвирусу, однако на данном этапе методы не рекомендованы к использованию.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

1.1. Рациональное и целевое использование продукции

В качестве вакцин для борьбы с нодулярным дерматитом используют живые аттенуированные штамма каприпоксвируса (Brenner *et al.*, 2006; Capstick & Coakley, 1961; Carn, 1993). Каприпоксвирусы являются кросс-реактивными в пределах рода. Следовательно, можно защищать КРС против нодулярного дерматита с помощью штаммов каприпоксвируса, полученных от овец и коз (Coackley & Capstick, 1961). В 1989 и 1990 году румынский штамм вакцины против оспы овец использовали для борьбы со вспышкой нодулярного дерматита в Египте (Michael *et al.*, 1996). Однако прежде, чем вводить новый вакцинный штамм, который обычно не используется для КРС, рекомендуется проводить контрольные пробные испытания, используя наиболее чувствительные породы. Длительность защиты,обеспеченной вакцинацией против нодулярного дерматита, неизвестна. Все штаммы каприпоксвируса, которые обычно используют в качестве вакцин, могут продуцировать сильную локальную реакцию в участке инокуляции у пород *Bos taurus* (Davies, 1991), поэтому некоторые владельцы скота считают их использование неприемлемым. Это препятствует использованию вакцины даже несмотря на то, что последствия вспышки нодулярного дерматита всегда более тяжелые. Соотношение риска и преимущества вакцинации необходимо оценить после обсуждения заинтересованных сторон.

2. План производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

Общие требования к помещениям, используемым для производства вакцин, а также для ведения документации и хранения записей в течение всего периода производства, описаны в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Документация должна включать стандартные операционные процедуры

(СОП) для метода производства и каждого этапа тестирования клеток и реагентов, используемых в процессе, каждой партии и конечного продукта.

2.1. Характеристика посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Каждый посевной штамм каприпоксвируса, используемый для производства вакцины, должен сопровождаться записями, четко и точно описывающими его происхождение, выделение и культуру ткани, или историю пассажей на животных.

Исходный посевной вакцинный вирус необходимо приготовить, заморозить или высушить и хранить при низких температурах, таких как -40°C или -80°C , чтобы обеспечить стабильность рабочего посевного материала для производства вакцины. Вирус необходимо культивировать в первичных или вторичных LT клетках овец шерстяного направления для получения максимального урожая. Также можно использовать клетки Vero.

Каждый посевной штамм должен быть безопасным для использования в отношении всех пород КРС, для которых он предназначен, включая молодых и беременных особей. Он не должен передаваться, должен оставаться аттенуированным после последующего пассажа в культуре клеток, и обеспечивать полную защиту от контрольного заражения вирулентными полевыми штаммами как минимум в течение 1 года. Он должен продуцировать минимум клинических реакций у всех пород КРС при введении рекомендуемым способом.

Необходимые испытания на иммуногенность и безопасность описаны в Разделе С.2.2.4 *Тестирование серии конечного продукта*.

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

Каждый посевной материал необходимо исследовать, чтобы гарантировать его идентичность и свободу от чужеродного вируса, в частности, пестивирусов, таких как пограничная болезнь овец и вирус диареи крупного рогатого скота, а также свободу от контаминации бактериями, грибами и/или микоплазмами.

Общий порядок проведения исследований на стерильность/чистоту описан в Главе 1.1.9 *Испытания на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов для ветеринарного использования*.

2.2. Метод производства

Метод производства должен быть задокументирован как План производства.

2.2.1. Процедура

Партии вакцин производят на свежих моно слоях вторичных LT клеток. Флакон с посевным вирусом восстанавливают с помощью минимальной обогативной среды Глазго (GMEM) и инокулируют на LT моно слой, который был предварительно промыт в теплом ФБР, и оставляют для абсорбции на 15 минут при температуре

37°C перед тем, как покрыть дополнительной минимальной обоготенной средой Глазго. Клетки необходимо собрать через 4-6 дней, когда ЦПД достигает 50-70%, чтобы инфекционность вируса была максимальной, или раньше, если ЦПД экстенсивно и очевидно, что они готовы отсоединиться. Культуру трижды подвергают замораживанию-оттаиванию, и суспензию восстанавливают и центрифугируют при 600 g в течение 20 минут. Перед сбором урожая культуру необходимо проверить на наличие неспецифического ЦПД, мутность среды или изменение рН среды. Для продуцирования достаточного количества вируса для производства серии продукта может потребоваться второй пассаж (для производства 10^6 доз требуется урожай из пяти флаконов объемом 175 см²).

Процедуру повторяют и каждый урожай (состоящий из очищенных надосаочных жидкостей) из индивидуально пронумерованного флакона смешивают отдельно с равным объемом стерильного, охлажденного 5%-го гидролизата лактальбумина и 10%-й сахарозы (растворенной в бидистиллированной воде или подходящем сбалансированном солевом растворе), переносят в индивидуально пронумерованные флаконы и хранят при температуре -20°C. Перед отправкой на хранение из каждого флакона берут по 0,2 мл для исследования на стерильность. Удаляют еще 0,2 мл; для определения титра вируса используют 2мл пулы, состоящие из 0,2 мл образцов, взятых из 10 флаконов. Для всех партий вакцины должны быть письменные записи всех процедур.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Необходимо задокументировать спецификацию и источник всех ингредиентов, использованных в производстве и провести исследование на посторонние вещества: бактерии, грибки, микоплазмы и вирусы. Подробная процедура тестирования описана в Главе 1.1.9. Использование антибиотиков должно соответствовать требованиям лицензирующего органа.

2.2.3. Контроль в процессе производства

i) Клетки

Необходимо поддерживать записи об источниках исходного клеточного материала. Количество клеток, прошедших самое большое и самое маленькое число пассажей, которые можно использовать для производства вакцины, должно быть указаны в плане производства. Если используются первичные клетки из семенников ягнят, клетки должны быть получены от здоровых молодых ягнят шерстяного направления из стада, свободного от скрепи. Во время культивирования за клетками необходимо наблюдать на предмет ЦПЭ, а также на предмет нормальной морфологии (преимущественно фибробластической). Как правило, можно проводить до 10 пассажей. При использовании для производства вакцины Для производства вакцины необходимо параллельно выращивать неинфицированные контрольные культуры и поддерживать их как минимум для проведения одного дополнительного пассажа для дальнейшего наблюдения. Их необходимо проверять на наличие не цитопатических штаммов пестивирусов, таких как вирус вирусной диареи крупного рогатого скота

или вирус пограничной болезни овец, с помощью иммунофлуоресценции или иммунопероксидазы или других подходящих методов. При возможности перед производством вакцины необходимо приготовить и проверить запас исходных клеток, который необходимо хранить в стерильном ДМСО (диметилсульфоксид) в жидком азоте (1-2 мл аликвоты, содержащие 20×10^6 клетки/мл).

ii) Сыворотка

Бычью сыворотку, используемую в питательной или поддерживающей среде, необходимо проверить, и она должна быть свободна от антител к каприпоксвирусу и контаминации пестивирусом или любыми другими вирусами, посторонними бактериями, микоплазмой или грибами.

iii) Среда

Должна быть проверена и свободна от антител к каприпоксвирусу и контаминации пестивирусом или любыми другими вирусами, посторонними бактериями, микоплазмой или грибами.

iv) Вирус

Посевной вирус и конечную вакцину необходимо титровать в колбах для культур клеток или титровальных микропланшетах. Минимальная рекомендуемая полевая доза вакцин из южно-африканского штамма Neethling (Mathijs *et al.*, 2016) составляет \log_{10} 3,5 ЦПД₅₀, а минимальная защитная доза \log_{10} 2,0 ЦПД₅₀. Каприпоксвирус крайне чувствителен к инаktivации солнечным светом, поэтому в полевых условиях допускается потеря активности. Рекомендуемая полевая доза вакцины для КРС из румынского штамма овечьей оспы составляет \log_{10} 2,5 инфицирующих овец доз (SID₅₀), а рекомендуемая доза для КРС вакцины из адаптированного RM-65 штамма румынской оспы овец - \log_{10} 3 ЦПД₅₀ (Coakley & Capstick, 1961). Образцы вакцины необходимо проверить на наличие занесенных вирусов, включая цитопатические и нецитопатические штаммы пестивируса, а также смешать с иммунной сывороткой каприпоксвируса с высоким титром, которая, по результатам исследований, является отрицательной на антитела к пестивирусам, чтобы предотвратить влияние самого вакцинного вируса на результаты исследования. Вакцину можно хранить при температуре -20°C до проведения всех испытаний на стерильность и завершения титраций, во время чего ее необходимо заморозить-оттаять. Дальнейшее титрование проводят на пяти произвольно выбранных флаконах с подвергнутому замораживанию-оттаиванию препаратом для подтверждения титра.

2.2.4. Испытания серии конечного продукта

i) Стерильность/чистота

Тесты на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов для ветеринарного использования можно найти в Главе 1.1.9.

ii) Безопасность и эффективность

Эффективность и безопасность должны быть подтверждены статистически достоверными исследованиями посредством контрольного заражения серонегативных молодых особей КРС европейских пород молочного направления. Рекомендуемая численность групп в данном случае может варьировать, если это статистически обоснованно. Пятнадцать особей КРС помещают в животноводческий комплекс с высоким уровнем защиты и отбирают образцы сыворотки. Пять произвольно выбранных флаконов с лиофилизированной вакциной, восстанавливают в ФБР и объединяют в один пул. Двум особям КРС инокулируют десятикратную полевую дозу вакцины, а восьми особям КРС – рекомендованную полевую дозу. Оставшиеся невакцинированные пять особей являются контрольными. Животных ежедневно проверяют на наличие клинических признаков и регистрируют ректальную температуру. На 21 день после вакцинации от шести животных снова отбирают образцы сыворотки и проводят их контрольное заражение штаммом каприпоксвируса с известной вирулентностью внутривенно или внутридермально (раствор вируса для контрольного заражения также должен быть свободным от посторонних вирусов). В течение последующих 14 дней фиксируют клиническое проявление. У животных в невакцинированной контрольной группе должны проявиться типичные клинические признаки нодулярного дерматита, в то время как у вакцинированных животных не должно наблюдаться никакой местной или системной реакции, кроме как приподнятости на коже в месте вакцинации, которая должна исчезнуть через 4 дня. На 30 день после вакцинации снова отбирают образцы сыворотки. Образцы, отобранные на 21 день после вакцинации, проверяют на сероконверсию к выбранным вирусным болезням, которые могли контаминировать вакцину, и сравнивают образцы, отобранные на 0 и 30 день, чтобы подтвердить отсутствие антител к пестивирусу. По причине вариабельности ответной реакции у КРС на контрольное заражение нодулярным дерматитом, у не у всех контрольных животных может наблюдаться генерализованная формы болезни, хотя должна быть сильная местная реакция.

iii) Иммуногенность серии

Тесты на иммуногенность на КРС должны проводиться в отношении вакцинных штаммов каприпоксвируса, если минимальная иммунизирующая доза неизвестна. Обычно он проводится путем сравнения титра вирулентного контрольного вируса на боковой части вакцинированных или контрольных животных. После вакцинации с боков как минимум трех животных и трех контрольных животных удаляют шерсть. Растворы контрольного вируса \log_{10} готовят в стерильном ФБР и шесть разведений вводят подкожно (0,1 мл на введение) по длине бока; четыре повторности каждого разведения вводят в нижней боковой области. У контрольных животных возможно появление отека во всех 24 местах введения, хотя в четырех местах, куда были введены наиболее разведенные инокуляты, реакция должна быть слабой или отсутствовать вовсе. У вакцинированных животных в местах введения в течение 24 часов должна развиваться первоначальная реакция гиперчувствительности, которая вскоре должна исчезнуть. В местах введения наиболее концентрированного контрольного вируса возможно образование небольших некротических участков. Вычисляют титр контрольного вируса для

вакцинированных и контрольных животных; разница титра $\log > \log_{10} 2,5$ считается свидетельством защиты.

2.3. Требования к авторизации

2.3.1. Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Вакцина должна быть безопасной для всех пород КРС, для которых она предназначена, включая молодых и беременных особей. Вирус в вакцине не должен быть трансмиссивным, и вакцина должна оставаться аттенуированной после последующего пассажа в культуре ткани.

Исследования на безопасность должны проводиться на каждой серии конечного продукта, как описано в Разделе С.2.2.4.

ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин

Выбранная конечная вакцина не должна возвращаться к вирулентности во время последующих пассажей на целевых животных.

iii) Экологические требования

Аттенуированные вакцины не должны иметь возможность автономно закрепиться в популяции КРС. Штаммы нодулярного дерматита не представляют собой опасности для человека.

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

Эффективность вакцины должна быть доказана в ходе экспериментов по контрольному заражению после вакцинации, проводимых в лабораторных условиях. Рекомендуемая численность групп в данном случае может варьировать, если это статистически обоснованно. Пятнадцать особей КРС помещают в животноводческий комплекс с высоким уровнем защиты и отбирают образцы сыворотки. Пять произвольно выбранных флаконов с лиофилизированной вакциной, восстанавливают в ФБР и объединяют в один пул. Двум особям КРС инокулируют десятикратную полевую дозу вакцины, а восьми особям КРС – рекомендованную полевую дозу. Оставшиеся невакцинированные пять особей являются контрольными. Животных ежедневно проверяют на наличие клинических признаков и регистрируют ректальную температуру. На 21 день после вакцинации от шести животных снова отбирают образцы сыворотки и проводят их контрольное заражение штаммом каприпоксвируса с известной вирулентностью внутривенно или внутридермально (раствор вируса для контрольного заражения также должен быть свободным от посторонних вирусов). В течение последующих 14 дней фиксируют клиническое проявление. У животных в не вакцинированной контрольной группе должны проявиться типичные клинические признаки

нодулярного дерматита, в то время как у вакцинированных животных не должно наблюдаться никакой местной или системной реакции, кроме как приподнятости на коже в месте вакцинации, которая должна исчезнуть через 4 дня. На 30 день после вакцинации снова отбирают образцы сыворотки. Образцы, отобранные на 21 день после вакцинации, проверяют на сероконверсию к выбранным вирусным болезням, которые могли контаминировать вакцину, и сравнивают образцы, отобранные на 0 и 30 день, чтобы подтвердить отсутствие антител к пестивирусу. По причине variability ответной реакции у КРС на контрольное заражение нодулярным дерматитом, у не у всех контрольных животных может наблюдаться генерализованная формы болезни, хотя должна быть сильная местная реакция.

После того как иммуногенность конкретного штамма, используемого для производства вакцины, была установлена в плане минимальной дозы, требуемой для обеспечения защиты, нет необходимости повторять данную процедуру в отношении каждой серии конечного продукта, если был установлен титр присутствующего вируса.

ii) Для контроля и искоренения

Вакцинация – это единственный эффективный способ борьбы со вспышками нодулярного дерматита в странах, где данная болезнь является эндемичной. К сожалению, в настоящее время нет маркерных вакцин, которые бы позволяли дифференцировать инфицированных животных и вакцинированных.

Иммунитет к вирулентному полевому вирусу после вакцинации длится в течение 2 лет, в случае с кенийским штаммом, и 3 года в случае с вакциной из южно-африканского штамма. Защита от генерализованной формы болезни после подкожного контрольного заражения длится в течение всей последующей жизни. Длительность иммунитета, вызванного другими вакцинными штаммами, необходимо установить для КРС путем проведения испытаний контрольным заражением в среде, где у полевых штаммов каприпоксвируса нет возможности повлиять на результаты.

2.3.3. Стабильность

Срок годности всех вакцин изначально составляет 24 месяца. Затем проводят исследование стабильности в реальном времени для подтверждения истечения срока годности. Для определения вариативности вакцины необходимо периодически в течение срока годности проводить повторное титрование серий вакцины.

Должным образом лиофилизированные вакцины против нодулярного дерматита, особенно те, что включают такой протективный агент, как сахароза и гидролизат лактальбумина, остаются стабильными в течение 25 лет, если температура хранения составляет -20°C , и от 2 до 4 лет, если температура

хранения составляет 4°C. Существует доказательство того, что они остаются стабильными и при более высоких температурах, но ни о каких долгосрочных экспериментах не сообщалось. Для лиофилизированных препаратов не требуется никаких консервантов, кроме таких протективных агентов, как сахароза и гидролизат лактальбумина.

3. Вакцины на основе биотехнологий

Разрабатывается новое поколение вакцин против каприпоксвируса, которое использует вирус нодулярного дерматита в качестве вектора для экспрессии и передачи иммуно-протективных белков других патогенов жвачных с потенциалом обеспечения двойной защиты (Borsha *et al.*, 2013; Wallace & Viljoen, 2005).

3.1. Доступные вакцины и их преимущества

В настоящее время рекомбинантные вакцины против каприпоксвируса нового поколения коммерчески недоступны.

3.2. Особые требования к биотехнологичным препаратам, если имеются

В настоящее время данные отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- BABIUK S., BOWDEN T.R., PARKYN G., DALMAN B., MANNING L., NEUFELD J., EMBURY-HYATT C., COPPS J. & BOYLE D.B. (2008). Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.*, 55, 299–307.
- BABIUK S., PARKYN G., COPPS J., LARENCE J.E., SABARA M.I., BOWDEN T.R., BOYLE D.B. & KITCHING R.P. (2007). Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19, 486–491.
- BALINSKY C.A., DELHON G, SMOLIGA G, PRARAT M, FRENCH R.A, GEARY S.J, ROCK D.L & RODRIGUEZ L.L. (2008). Rapid preclinical detection of sheep pox virus by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 438–442.
- BOSHRA H., TRUONG T., NFOR C., GERDTS V., TIKOO S., BABIUK L.A., KARA P., MATHER A., WALLACE D. & BABIUK S. (2013). Capripoxvirus-vectored vaccines against livestock diseases in Africa. *Antiviral Res.*, 98, 217–227.
- BOWDEN, T.R, BABIUK S.L, PARKYN G.R., COPPS J.S. & BOYLE D.B. (2008). Capripox virus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371, 380–393.
- BRENNER J., HAIMOVITZ M., ORON E., STRAM Y., FRIDGUT O., BUMBAROV V., KUZNETZOVA L., OVED Z., WASERMAN A., GARAZZI S., PERL S., LAHAV D., EDERY N. & YADIN H. (2006). Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel. *Isr. J. Vet. Med.*, 61, 73–77.
- BURDIN M.L. (1959). The use of histopathological examination of skin material for the diagnosis of lumpy skin disease in Kenya. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 7, 27–36.
- CAPSTICK P.B. & COAKLEY W. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Trials with a vaccine against Neethling type infection. *Res. Vet. Sci.*, 2, 362–368
- CARN V.M. (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, 11, 1275–1279.
- CARN V.M. & KITCHING, R.P. (1995). The clinical response of cattle following infection with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch. Virol.*, 140, 503–513.
- COAKLEY W. & CAPSTICK P.B. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Factors affecting small scale production of tissue culture propagated virus vaccine. *Res. Vet. Sci.*, 2, 369–371.
- COETZER J.A.W. (2004). Lumpy skin disease. In: *Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition Coetzer J.A.W. & Justin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1268–1276.

- DAS A., BABIUK S. & MCINTOSH M.T. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 1613–1620.
- DAVIES F.G. (1991). *Lumpy Skin Disease, a Capripox Virus Infection of Cattle in Africa*. FAO, Rome, Italy. DAVIES F.G., KRAUSS H., LUND L.J. & TAYLOR M. (1971). The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Res. Vet. Sci.*, 12, 123–127.
- HAIG D. (1957). Lumpy skin disease. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 5, 421–430.
- IRELAND D.C. & BINEPAL Y.S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods*, 74, 1–7.
- IRONS P.C., TUPPURAINEN E.S.M. & VENTER E.H. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, 63, 1290–1297.
- KITCHING R.P. & SMALE C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, 41, 425–427.
- LAMIEN C.E., LELENTA M., GOGER W., SILBER R., TUPPURAINEN E., MATIJEVIC M., LUCKINS A.G. & DIALLO A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses *J. Virol. Methods*, 171, 134–140.
- MATHIJS E., VANDENBUSSCHE F., HAEGEMAN A., KING A., NTHANGENI B., POTGIETER C., MAARTENS L., VAN BORM S. & DE CLERCQ K. (2016). Complete Genome Sequences of the Neethling-Like Lumpy Skin Disease Virus Strains Obtained Directly from Three Commercial Live Attenuated Vaccines. *Genome Announc.*, 4 (6). pii: e01255-16. doi: 10.1128/genomeA.01255-16.
- MURRAY L., EDWARDS L., TUPPURAINEN E.S., BACHANEK-BANKOWSKA K., OURA C.A., MIOULET V. & KING D.P. (2013). Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Vet. Res.*, 9, 90.
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2015). *Lumpy Skin Disease*. World Animal Health Information Database: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home. OMOGA D.C.A., MACHARIA M.,
- MAGIRI E., KINYUA J., KASIITI J. & HOLTON T. (2016). Molecular based detection, validation of a LAMP assay and phylogenetic analysis of capripoxvirus in Kenya. *J. Adv. Biol. Biotech.*, 7, 1–12.
- PROZESKY L. & BARNARD B.J.H. (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 49, 167–175.

Rouby S. & Aboulsoudb E. (2016). Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *Vet. J.*, 209, 193–195.

TUPPURAINEN E.S.M., VENTER E.H. & COETZER J.A.W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 72, 153–164.

TUPPURAINEN E.S., VENTER E.H., COETZER J.A. & BELL-SAKYI L. (2015). Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks Tick Borne Dis.*, 6, 134–140.

WALLACE D.B. & VILJOEN G.J. (2005). Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, 23, 3061–3067.

WEISS K.E. (1968). Lumpy skin disease. *Viol. Monogr.*, 3, 111–131

*

* *

NB: Существуют справочные лаборатории МЭБ по нодулярному дерматиту (см. Таблицу в Части 4 этого Наземного Руководства или проконсультируйтесь в веб-сайте МЭБ, чтобы получить актуальный список : <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против нодулярного дерматита

NB: ПРИНЯТА В ПЕРВЫЙ РАЗ В 1989 г. ПОСЛЕДНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОТ 2017 г.