

ГЛАВА 3.4.8.

КОНТАГИОЗНАЯ ПЛЕВРОПНЕВМОНИЯ КРС (ИНФЕКЦИЯ MYCOPLASMA MYCOIDES ПОДВИД MYCOIDES SC)

РЕЗЮМЕ

Контагиозная плевропневмония КРС – это болезнь жвачных (родов *Bos* и *Bubalus*), вызываемая *Mycoplasma mycoides* подвид *mycoides* SC (MmmSC; SC = маленькая колония). Болезнь проявляется в отсутствии аппетита, лихорадке и таких респираторных признаках, как затрудненное, учащенное дыхание, кашель и выделения из носа у бычьих. Диагностика требует выделения этиологического агента. Основными проблемами, связанными с контролем и искоренением болезни, являются частое возникновение подострой и субклинической инфекции, персистенность хронических носителей после клинической фазы и отсутствие экстенсивного охвата вакцины.

Идентификация возбудителя: Образцы, отбираемые от живых животных, представляют собой назальные мазки и/или бронхо-ольвеолярные смывы или плевральную жидкость, полученные посредством пункции. Образцы, которые необходимо отбирать при вскрытии, поражения легких, лимфатические узлы, плевральная жидкость и синовиальная жидкость от животных с артритом.

Для культивирования патогена ткани перемалывают в забуференном растворе и инокулируют в селективный бульон и плотную питательную среду с антибиотиками или другими ингибиторами, чтобы предотвратить рост бактерий с клеточными стенками. Рост Mmm может занимать до 10 дней, в зависимости от типа образца и титра микоплазмы.

В бульоне рост наблюдается как гомогенное помутнение, которое при встряхивании формирует воронку; на агаре развиваются маленькие колонии, диаметром 1 мм, форма которых напоминает классическую “яичницу”. Mmm обладает следующими биохимическими характеристиками: чувствительность к дигитонину, снижение тетразолиевых солей, ферментация глюкозы, отсутствие гидролиза аргинина, а также отсутствие или очень слабая фосфатазная и протеолитическая активность. Описаны специальные среды, которые рекомендуются для проведения данных тестов. Диагноз подтверждается иммунологическими тестами, такими как реакция подавления роста и реакция иммунофлуоресценции (оба проводятся с использованием гипериммунной сыворотки). Полимеразная цепная реакция является быстрым, специфическим, чувствительным и легким в проведении тестом.

Серологические тесты: В диагностических целях перед перемещением животных, в том числе с целью международной торговли, по-прежнему предписывают реакцию связывания комплемента, модификация Campbell и Turner. Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ также подходит для сертификации животных перед их перемещением. Иммуноблоттинг прошел оценку и является высокоспецифичным и чувствительным.

Требования к вакцинам: В настоящее время для производства вакцины рекомендуется использовать аттенуированные штаммы T1/44 и T1sr. Минимальный требуемый титр 10^7 микоплазм на дозу вакцины, однако, рекомендуется использовать титр, который составляет как минимум 10^8 .

А. ВВЕДЕНИЕ

Контагиозная плевропневмония КРС - инфекционная и контагиозная респираторная болезнь *Bovidae*, вызываемая *Mycoplasma mycoides* подвид *mycoides* “маленькая колония” (*MmmSC*), которое оказывает сильное влияние на производство сельскохозяйственных животных и имеет высокий потенциал быстрого распространения. Как результат, страны, инфицированные контагиозной плевропневмонией КРС, исключены из международной торговли сельскохозяйственными животными.

MmmSC – это микоплазма, т.е. бесстеночная бактерия (молликут), которая принадлежит к так называемому “кластеру мукоидов”, который образует пять видов микоплазм, являющихся патогенами жвачных (*Manso-Silvan et al.*, 2009). У данных пяти видов микоплазм одинаковые фенотипические и генотипические характеристики, которые вызывают перекрестные реакции при традиционных диагностических методах. Ближайшим родственником *MmmSC* является *M. mycoides* подвид *capri* (*Mmc*), который обычно встречается у коз.

В естественных условиях *MmmSC* поражает только жвачных рода *Bos*, т.е. в основном КРС, зебу, яков (*Bos grunniens*) и буйволов (*Bubalus bubalis*) (*Santini et al.*, 1992). *MmmSC* выделяют у овец и коз в Африке, Португалии и Индии (*Srivastava et al.*, 2000). Что касается диких животных, был зарегистрирован один случай у американского буйвола (*Bison bison*); ни одного случая не было зарегистрировано среди африканских буйволов (*Syncerus caffer*) или других диких жвачных. Мелкие жвачные не играют никакой роли в эпизоотологии болезни, и контагиозная плевропневмония КРС не является зоонозным агентом.

Инкубационный период для естественно инфицированных животных составляет от 3 недель до 6 месяцев. Клинические проявления болезни у КРС варьирует от сверхострой до острой, подострой и хронической формы.

Контагиозная плевропневмония КРС проявляется в отсутствии аппетита, лихорадке и таких респираторных признаках, как затрудненное, учащенное дыхание, кашель и выделения из носа на острой стадии болезни, когда возбудитель может быстро распространяться; на хронической стадии может наблюдаться долгосрочная персистенция возбудителя. Типичные поражения включают одностороннюю пневмонию, ассоциированную с плевритом. На хронической стадии болезни клинические признаки ослабевают, поэтому инфицированных животных сложнее идентифицировать. В этих случаях в легких могут содержаться типичные инкапсулированные поражения, называемые секвестрами. Такие “скрытые” носители могут быть заразными и, таким образом, отвечают за незаметную персистенцию инфекции в стаде; они играют важную роль в поддержании и эпизоотологии болезни.

Контагиозную плевропневмонию КРС безусловно идентифицируют в Европе с 18 века, и она получила всемирное распространение во второй половине 19 века чрез торговлю КРС. Во многих странах контагиозная плевропневмония КРС была искоренена в начале 20 века,

в основном посредством применения стратегии полного санитарного убоя (Соединенное Королевство, США) или путем проведения кампаний по вакцинации, после которых следовал полный санитарный убой (Австралия). Сегодня контагиозная плевропневмония КРС остается энзоотической во многих расположенных к югу от Сахары странах, в то время как в Европе последние случаи контагиозной плевропневмонии КРС наблюдались в Португалии в 1999 году. В некоторых азиатских странах ситуация неясна.

В полевых условиях контагиозную плевропневмонию КРС можно спутать с другими болезнями, вызывающими респираторные проблемы, такими как пастереллез или микоплазмоз. Отсутствие подтверждающей диагностики может привести к тому, что в случае вспышки контагиозной плевропневмонии КРС придется прибегнуть к лечению антибиотиками.

В настоящее время не существует каких-либо известных рисков заражения людей *Mmm*. Меры биобезопасности определяются путем проведения анализа рисков, как описано в Главе 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарт управления рисками в ветеринарной лаборатории и вивариях*. В местностях, свободных от контагиозной плевропневмонии КРС, рекомендуется работать с *MmmSC* в лабораториях 2 степени биобезопасности (BSL), а в энзоотических зонах достаточно BSL 1. В отношении всех процедур должны использоваться надлежащие лабораторные практики.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Клиническая диагностика контагиозной плевропневмонии КРС является ненадежной, поскольку первичные признаки могут быть слабыми или вовсе отсутствовать и могут не отличаться от тяжелой формы пневмонии. Таким образом, контагиозную плевропневмонию КРС необходимо расследовать с помощью патологических, микробиологических, молекулярных или серологических диагностических методов. Поскольку патологические поражения контагиозной плевропневмонии КРС являются дистинктивными и патогномичными – надзор за контагиозной плевропневмонией КРС на бойне, который включает обследование легких, является практическим методом мониторинга болезни.

Для подтверждения вспышки рекомендуется выделить и идентифицировать возбудитель. В Таблице 1 перечислены лабораторные методы, используемые для диагностики контагиозной плевропневмонии КРС.

Таблица 1. Лабораторные методы, используемые в настоящее время для диагностики контагиозной плевропневмонии КРС, и их цель

Метод	Цель					
	Свобода популяци и от инфекции	Свобода животного от инфекции до перемещения	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Частота случаев инфекции и - надзор	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации *
Обнаружение и идентификация возбудителя¹						
Выделение культуры <i>in-vitro</i> (с последующими тестами на идентификацию вида)	+++	-	-	+++	-	-
Прямой молекулярный тест (ПЦР)	-	-	-	++	-	-
Обнаружение иммунного ответа						
РСК	+++	+++	+++	++	+++	-
Иммуноблоттинг	++	++	++	++	+++	-
К-ИФА	+++	+++	+++	+++	+++	-

*NB: в настоящее время в таблице не приводится описание теста, который бы позволил провести оценку иммунного статуса животного после вакцинации имеющимися штаммами T1.

Разъяснение: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = можно использовать в некоторых ситуациях, однако стоимость, надежность или другие факторы сильно ограничивают применение; - = не подходит для данной цели.

Несмотря на то, что не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ прошли формальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что они широко используются и не дают сомнительные результаты, делает их допустимыми.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РСК = реакция связывания комплемента;

К-ИФА = конкурентный иммуносорбентный ферментный анализ.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Образцы

Ключ успеха при выделении лежит в сборе образцов хорошего качества. MmmSC можно выделить из образцов, отобранных либо от живых животных, либо при вскрытии. Образцы от живых животных включают: назальные мазки или выделения из носа, бронхоальвеолярный лаваж или транстрахеальный смыв и плевральную жидкость, отобранную в асептических условиях путем прокола нижней части грудной полости между седьмым и восьмым ребрами. Образцы, отбираемые при вскрытии, включают: легкие с поражениями,

¹ Рекомендуется использование нескольких методов идентификации возбудителя в отношении одного и того же клинического образца.

плевральную жидкость (“лимфа”), лимфатические узлы бронхо-пульмонального тракта и синовиальную жидкость от животных с артритом. Образцы легких необходимо отбирать от поражений на границе больной и нормальной ткани.

При отборе образцов назальных мазков необходимо использовать транспортную среду, чтобы защитить микоплазмы и предотвратить пролиферацию бактерий с клеточными стенками (бульон с экстрактом сердца без пептона и глюкозы, 10% экстракт из дрожжей, 20% сыворотка, 0,3% агар, 500 международных единиц [МЕ]/мл пенициллина, 0,2 г/л ацетата таллия).

После отбора все образцы необходимо хранить в холодильнике при температуре 4°C и отправить в лабораторию в течение 24 часов. Если отправка осуществляется позднее – образцы необходимо заморозить или хранить при температуре $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

1.2. Культура *in-vitro*

Наличие патогена сильно зависит от стадии развития поражений, и отрицательный результат не является заключительным, особенно если животное лечили антибиотиками.

MmmSC нужна селективная среда для роста, однако это неприхотливая микоплазма. Существует несколько составов сред, которые используют в различных референтных лабораториях, однако фактически они должны содержать: базовую среду, такую как бульон с экстрактом сердца или PPL0 бульон (из плевропневмониеподобных микроорганизмов), 1-2,5% дрожжевой экстракт, 10-20% инактивированную лошадиную сыворотку, 0,1% глюкозу, 1% триптозу и 0,0024% ДНК. Чтобы избежать роста других бактерий среда может также содержать антибиотик семейства пенициллинов (например, 500 МЕ/мл пенициллин G), поскольку микоплазмы являются естественно резистентными. Можно использовать как твердую среду, так и бульон. Все приготовленные среды подвергаются контролю качества и должны поддерживать рост низкого пассажа *Mycoplasma spp.* из небольшого количества инокулята. Чтобы обеспечить правильное проведение тестов необходимо культивировать референтный штамм параллельно с подозреваемыми образцами.

После обработки бульоном образцы ткани десятикратно разбавляют, чтобы минимизировать количество контаминирующих бактерий, и вносят в пять пробирок с бульоном и пять планшетов с твердой средой. В качестве альтернативы, чтобы избежать контаминацию бактериями и сократить количество пробирок и планшетов на образец, необходимо инокулировать супернатант измельченной пробы через 25-мм фильтр, с размером отверстий 0,45. Плевральную жидкость можно инокулировать напрямую, без предварительного разбавления или фильтрации, поскольку, если она инфицирована, она представляет собой практически чистую культуру микоплазмы. Для обеспечения наилучших условий для роста микоплазмы пробирки и чаши Петри инкубируют при температуре 37°C в 5% CO₂ и проверяют ежедневно в течение 10 дней. Если по истечении данного времени роста не наблюдается, образцы считаются отрицательными. Положительные образцы в жидкой среде демонстрируют гомогенную мутность, обычно через 2-4 дня, часто представленную шелковистыми хрупкими нитями, называемыми “кометами”. В последующие дни образуется равномерное помутнение, а при встряхивании образуются воронки. На агаровой среде колонии маленькие (1 мм в диаметре) и имеют классический вид “яичницы” с плотным центром. На этой стадии для

идентификации колоний можно провести биохимический тест, непрямую реакцию флюоресцирующих антител (РНИФ) или полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

1.3. Биохимический и иммунологический идентификационные тесты

Биохимические тесты раньше проводились в плановом порядке, однако сейчас их заменили другие тесты, а именно ПЦР. С помощью одних биологических тестов нельзя произвести идентификацию точного вида *Mycoplasma* из-за пересечения некоторых фенотипических характеристик, которые можно оценить. Таким образом, для идентификации изолятов рекомендуются молекулярные тесты, такие как ПЦР. Биохимические методы приводятся ниже для исторической справки.

После субкультивирования необходимо удалить из среды антибиотики, чтобы проверить, является ли изолят микоплазмой или бактерией L-формы, которая восстанавливает свою оригинальную форму в среде без ингибиторов. После проведения данного теста организм можно идентифицировать с помощью биохимического теста (Freundt *et al.*, 1979).

MmmSC чувствительна к дигитонину (как все члены отряда *Mycoplasmatales*), не продуцирует “пленку и пятна”, ферментирует глюкозу, снижает тетразолиевые соли (аэробно или анаэробно), не гидролизует аргинин, не имеет фосфатазной активности и имеет низкую протеолитическую активность или не имеет ее вовсе.

Для данных тестов была разработана специальная среда, которая включает те же основные ингредиенты (бульон с экстрактом сердца или Vacto PPL0 бульон, лошадиную сыворотку, 25% раствор дрожжевого экстракта, 0,2% раствор ДНК) и в которую добавили 1% 50%-го раствора глюкозы для гидролиза глюкозы, 4% 38%-го раствора аргинина гидрохлорида для гидролиза аргинина, и 1% 2%-го раствора трифенилтетразолия хлорида для редукции тетразолия, а также рН индикатор (например, феноловый красный). (Примечание: рН индикатор не добавляют в среду, содержащую трифенилтетразолия хлорид.) Для демонстрации протеолиза выращивание проводят на казеиновом агаре и/или на агаре, содержащем коагулированную сыворотку.

После проверки биохимических характеристик можно провести один из следующих иммунологических тестов, чтобы подтвердить идентификацию: реакция задержки роста с использованием диска (DGIT) (Freundt *et al.*, 1979), реакцию флюоресцирующих антител (FAT), РИФ, реакцию иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) (Provost, 1972) или дот иммуноблоттинг на мембранном фильтре (MF-dot) (Brocchi *et al.*, 1993).

В настоящее время мало лабораторий использует рутинные иммунохимические тесты для обнаружения и идентификации *MmmSC* по причине разработки тестов на основе ПЦР, которые являются более специфичными, чувствительными, быстрыми и легкими в плане проведения и стандартизации.

1.4. Методы молекулярной идентификации и типирования – тесты на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Смотрите Главу 1.1.6. *Принципы и методы валидации диагностических исследований в отношении инфекционных болезней* для получения более подробной информации о применении и валидации тестов на основе ПЦР.

ПЦР стала предпочтительным методом по причине возможности быстрой и специфической идентификации *MmmSC*, когда организм выделен из клинического образца. Чтобы избежать перекрестной контаминации и контаминацию следами предыдущей пробы необходимо четкое разделение лабораторных помещений, используемых для подготовки ПЦР и проведения реакций. Разные авторы разработали систему ПЦР для идентификации *MmmSC*, и предпочтительного метода нет. Тем не менее, следует избегать проведения более чувствительной гнездовой ПЦР из-за высокого риска наличия следов предыдущего продукта ПЦР, который приведет к ложному положительному результату. Поскольку мишень ДНК находится не в образце, где количество клеток варьирует, и могут присутствовать ингибиторы ПЦР, а в изолятах – чувствительность является не критическим пунктом. Праймеры, комплементарные области ДНК CAP-21, гену *IrrA* и гену 16S рРНК генома *MmmSC*, были разработаны разными авторами и используются в системах ПЦР, после чего проводится рестрикционный эндонуклеазный анализ продукта амплификации (ампликона) (PCR-REA) или повторная амплификация (гнездовая ПЦР) (Таблица 2).

Таблица 2. Традиционные ПЦР системы, наиболее часто используемые для идентификации *MmmSC*

Целевая область ДНК	Ампликон (п.о.)	Рестрикционный фермент	Продукты гидролиза (п.о.)	Специфичность	Ссылка
CAP-21 (позиция:181628)	574	<i>AsnI</i>	379, 178, 220, 178, 153	<i>MmmSC</i> <i>Mmc</i>	Bashiruddin <i>et al.</i> , 1994
(позиция:443115)	275	<i>Asel</i>	232, 43	<i>MmmSC</i>	Dedieu <i>et al.</i> , 1994**
Ген <i>IrrA</i> (гнездовой)	717	-		<i>MmmSC</i>	Miserez <i>et al.</i> , 1997***
(позиция: 20061)	503				

*Номер доступа последовательности *MmmSC* PG 1 в банке генов: NC005364

** Последовательность праймера: *MSC1*: ATA-CTT-CTG-TTC-TAG-TAA-TAT-G; *MSC2*:CTG-ATT-ATG-ACA-GTG-GTC-A

*** Последовательность праймера: *SC3NEST1-L*: ACA-AAA-AGA-AGA-TAT-GGT-GTT-GG и *SC3NEST1-R*: ATC-AGG-TTT-ATC-CAT-TGG-TTG-G; *SC3VII*: ATT-AGG-ATT-AGC-TGG-TGG-AGG-AAC и *SC3IV-S*: TCT-GGG-TTA-TTC-GAA-CCA-TTA-T

В качестве примера системы ПЦР, используемой при рутинной идентификации *MmmSC*, ниже приводится процедура PCR-REA, по материалам Bashiruddin *et al.*, 1994. Одноэтапная ПЦР была также описана Miles *et al.* (2006).

1.4.1. Выделение ДНК

Для выделения ДНК подходит любой принятый метод. Простым и эффективным методом является выбор единичной колонии, ресуспендированной в 100μл воды класса ПЦР. Далее ее варят в течение 15 минут, чтобы лизировать клетки и освободить ДНК, а затем центрифугируют при 1500 g в течение 1 минуты. Супернатант с ДНК используется для реакции ПЦР после разведения 1/10 в воде класса ПЦР. В качестве альтернативы 500 μл

четырёхдневной бульонной культуры, из единичной колонии, центрифугируют при 1500 g в течение 5 минут, осадок ресуспендируют в 100µл воды класса ПЦР, кипятят и центрифугируют, как описано выше. После разбавления 1/10, 1 µл супернатанта используют в ПЦР.

1.4.2. Амплификация ПЦР

i) Приготовление мастер-микса

Синтетические олигонуклеотиды растворяют в TE буфере (Трис-EDTA [этилен-диамин-тетрауксусная кислота]) до концентрации 100 µM. Данный матричный раствор стабилен при температуре -20°C как минимум в течение 4 лет. Рабочий раствор готовят из матричного раствора путем разведения ½ до получения итоговой концентрации 50 µM. При конечном объеме в 25 µM ПЦР должна включать следующее:

	Концентрация	Объем в одной реакции (общий объем 25 µл)	Конечная концентрация в реакции
H ₂ O класса ПЦР	-	16 µл	-
Рабочий буферный раствор без MgCl ₂	10×	2,5 µл	1×
MgCl ₂	25 mM	3 µл	3mM
дНТФ	10 mM	1 µл	400 µM
Праймер MM450*	50 µM	0,5 µл	1 µM
Праймер MM451**	50 µM	0,5 µл	1 µM
ДНК-полимераза Taq	5 E/ µл	0,5 µл	2,5 E
Матричная ДНК	1 µл		

*Последовательность: 5'-GTA-TTT-TCC-TTT-СТА-АТТ-TG-3'

**Последовательность: 5'-AAA-TCA-AAT-TAA-TAA-GTT-TG-3'

ii) Условия амплификации

К миксу добавляют 1 µл матричной ДНК исследуемого образца, или положительный контроль (ДНК от штамма PG1 типа *MmmSC*), или отрицательный контроль (вода). Амплификацию проводят в следующих условиях: 30 циклов при температуре 94°C в течение 1 минуты, при 50°C в течение 1 минуты, при 72°C в течение 2 минуты; держат при температуре 4°C неопределенный период времени.

iii) Детекция амплифицированных продуктов

После амплификации реакции ставятся в отдельном помещении, где обнаруживают продукты ПЦР с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в течение 2 часов при 90 V. Положительные реакции и положительный контроль, но не отрицательный контроль, должны дать ампликон в 574 пн, видимый при УФ освещении после окрашивания подходящей флуоресцирующей краской.

1.4.3. Анализ рестрикционной эндонуклеазы (REA)

Энзимная рестрикция продукта ПЦР проводится в 10 µл реакционной смеси, в которой содержится: 2 µл реакционной ПЦР смеси, 5 E AsnI (2 µл), 1× буфер, при температуре

37°C в течение 1 часа. Результат анализируют с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в течение 1 часа при 100 V, а продукт визуализируют, как указано выше.

Идентификация основывается на размерах продуктов рестрикции, как представлено в Таблице 2.

Примечание: прямое детектирование и идентификация *MmmSC* с помощью ПЦР в клинических образцах оценено не в полной мере, поэтому традиционная ПЦР может не подойти из-за наличия ингибиторов ПЦР, меньшего количества микроорганизмов в образце и наличия других бактерий, которые снижают чувствительность и специфичность. Эти проблемы можно избежать, используя ПЦР в реальном времени для обнаружения *MmmSC*, поскольку свечение, полученное в результате специфической геномной амплификации обнаруживается и измеряется по мере синтеза ампликона, и, таким образом, получают повышение чувствительности в 2-3 log, по сравнению с традиционной ПЦР (Lorenzon *et. al.*, 2008). Если используются такие образцы как плевральная жидкость – ПЦР можно проводить после кипячения образца и центрифугирования для извлечения ДНК из супернатанта. Что касается фрагментов легких, ПЦР проводят после процедуры экстракции ДНК, используя набор для экстракции или экстракцию фенолом/хлороформом.

1.4.4. Типирование штамма *MmmSC*

Энзимная рестрикция продукта ПЦР проводится в 10 µл реакционной смеси, в которой содержится: 2 µл реакционной ПЦР смеси, 5 Е *Asnl* (2 µл), 1× буфер, при температуре 37°C в течение 1 часа. Результат анализируют с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в течение 1 часа при 100 V, а продукт визуализируют, как указано выше.

2. Серологические тесты

Серологические тесты на СВРР являются действительными только на уровне стада, поскольку в случае с отдельными животными могут возникать ложно положительные или ложно отрицательные результаты. Тестирование отдельных животных может быть недостоверным либо потому что животное находится на ранней стадии болезни, которая может длиться несколько месяцев, прежде чем выработаются антитела, либо болезнь имеет хроническую форму, т.е. очень малое число животных является сероположительными. Ложно-положительные результаты могут возникнуть (2%) главным образом по причине перекрестных реакций другими микоплазмами, в частности другими членами кластера *M. mycoides*. Правильность результатов необходимо подтвердить путем послеубойного и бактериологического осмотра и серологических тестов крови, отобранной во время убоя.

Для программ скрининга и искоренения рекомендуется проводить реакцию связывания комплемента (РСК) и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Высокоспецифичный иммуноблоттинг проводят как подтверждающий тест, но он не подходит для массового скрининга.

2.1. Реакция связывания комплемента (рекомендуется для определения статуса свободы от болезни)

Реакция связывания комплемента, модифицированная Campbell&Turner, является рекомендованной процедурой и широко используется во всех странах, где появляется инфекция (Provost *et al.*, 1987). Наиболее традиционно реакция связывания комплемента проводится в формате микротитрования, и данная процедура гармонизирована в пределах ЕС (Европейская комиссия, 2001 год).

Благодаря чувствительности 63,8% и специфичности 98% (Bellini *et al.*, 1998), с помощью реакции связывания комплемента можно обнаружить практически всех больных животных с тяжелыми поражениями, но при этом очень малое число животных на ранних стадиях болезни или животных с хроническими поражениями.

2.1.1. Реагенты

Для валидации и аккредитации реакции связывания комплемента контроль качества и стандартизация всех реагентов является критическим вопросом, как и пипетки с наконечниками, используемые для их распределения. Для того, чтобы упростить процедуру аккредитации (ISO/IEC² 17025) можно приобрести соответствующий антиген и контрольные сыворотки для СВРР из Референтной лаборатории МЭБ.

Необходимо учитывать следующие характеристики реагентов, поскольку они могут оказать влияние на конечный результат.

- i) Стерилизованная вода высокой степени очистки. Качество воды является критическим для развития реакции.
- ii) Положительная референтные сыворотки: в целях гармонизации в Референтной лаборатории МЭБ в Португалии и Италии имеется положительная референтная стандартная сыворотка КРС (PRS). Она используется в диагностических лабораториях для рутинных процедур и титрования антигена. PRS получают от КРС, естественно инфицированных СВРР. Она является отрицательной к *Brucella*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Chlamydia*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira*, вирусу вирусной диареи КРС, респираторно-синцитиальному вирусу, вирусу инфекционного ринотрахеита КРС, аденовирусу, вирусу герпеса КРС 4, вирусу ящура, вирусу лейкоза КРС и вирусу парагриппа 3, а также одна должна быть отрицательной к занесенным вирусам. PRS представляет 0% гемолиз в разведении 1/160 и 50% гемолиз в разведении 1/320. PRS необходимо хранить при температуре -20°C в аликвотах, чтобы предотвратить повторную заморозку-оттаивание, которая вызывает порчу сыворотки.
- iii) Отрицательные референтные сыворотки: отрицательная контрольная сыворотка (NRS) также доступна в Референтных лабораториях МЭБ в Португалии и Италии. Это сыворотка от здоровых КРС из источника, свободного от губкообразной энцефалопатии КРС (ГЭ КРС). Она свободна от СВРР и должна быть отрицательной по вышеуказанным микроорганизмам. Отрицательную контрольную сыворотку хранят в аликвотах при температуре -20°C.
- iv) Антиген: Для проведения испытания необходимо использовать антиген, приготовленный из суспензии выбранного штамма Mmm, который исследовали прежде и который представляет пять специфических полос антигена: 110, 98, 95,

² ISO/IEC: Международная организация по стандартизации/ Международная электротехническая комиссия

62/60 и 48 кДа. Предварительно проводят титрование антигена в шахматном порядке и затем используют его в дозе 2 единиц компонента (CFU), стандартизируют, чтобы дать 50% связывание, при разведении 1/320 PRS. Хранят при температуре $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, не замораживая. Производится, стандартизируется и поставляется Референтными лабораториями МЭБ. Использование антигена, стандартизированного против референтных сывороток МЭБ, способствует гармонизации диагностического тестирования на международном уровне.

- v) Буфер: раствор вероналового буфера (VB), $\text{pH } 7,2 \pm 1$ – это стандартный разбавитель для РСК. Вероналовый буфер можно приготовить из таблеток, свободно доступных в продаже, или из исходного раствора хлорида натрия (42,5 г), барбитуровой кислоты (2,875 г), натриевого соединения диэтилбарбитуровой кислоты (1,875 г), хлористого магния ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0.501$ г) и хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0.18$ г) в 1 литре дистиллированной воды. Перед использованием концентрированный исходный раствор разбавляют 1/5 в воде, прошедшей двойную дистилляцию.
- vi) Гемолизин (амбоцептор): гемолизин – это гипериммунная кроличья сыворотка к SRBC (красные кровяные клетки овец). Используемое количество – 6 гемолитических доз, считываемых при 50% конечной точки (HD50 [50% гемолизирующая доза]). SRBC получают путем асептического прокалывания яремной вены. Их можно хранить в растворе Олсвера или в цитрате натрия. Их используют в 6% суспензии. Гемолизин также свободно доступен в продаже.
- vii) Гемолитическая система (HS): HS готовят путем разбавления гемолизина в VB до получения дозы 12HD50. Добавляют такой же объем 6% суспензии антител к SRBC, систему синсibilизируют в водяной ванне при температуре 37°C в течение 30 минут, периодически встряхивая.
- viii) Комплемент (C'): C' получают из сыворотки здоровых морских свинок. Его лиофилизируют и восстанавливают с помощью воды, прошедшей двойную дистилляцию. После восстановления хранят при температуре -20°C . Можно использовать имеющийся в продаже комплемент в соответствии инструкциями производителя. Титрование проводят путем создания серий разведений в VB, содержащем соответствующее количество антигена, которые затем используют в исследовании. После инкубирования при температуре 37°C в течение 30 минут к каждому разведению добавляют соответствующее количество сенсibilизированных SRBC. Титр считывают после инкубирования в течение последующих 30 минут. Наивысшее разведение, дающее полный гемолиз SRBC равен 1C' единице, из чего можно рассчитать разведение, необходимое для 2,5 единиц в 25 $\mu\text{л}$.

2.1.2. Процедура тестирования (с использованием микропланшетов)

Наиболее критическими факторами для успешного проведения реакции связывания компонента являются контроль реагентов и наличие опытного и квалифицированного персонала. Также необходимо тщательно контролировать температуру и время инкубирования. Вся процедура должна проводиться в помещении, где контролируются температура, и где она составляет $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Контаминированные или гемолизированные сыворотки не исследуют, так как это может препятствовать реакции. Неразбавленные образцы тестовой сыворотки и соответствующие рабочие стандарты инактивируют в течение 30 минут в водяной бане при температуре $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Это уничтожит комплемент сывороток и снизит или ликвидирует анти-комплиментарную активность (АСА).

Обычно рутинно исследуют только одно разведение сыворотки (1/10 в VB), однако для положительного контроля (PRS) необходимо делать серийные разведения. Используя стандартный 96-луночный микропланшет с круглым (U-образным) дном, проводят следующую процедуру:

- i) 25μл тестовой сыворотки, инактивированной и разведенной 1/10 в VB, распределяют по лункам первого и второго ряда. Первый ряд служит анти-комплиментарным контролем для каждой сыворотки.
- ii) В каждую лунку добавляют по 25 μл антигена в дозе 2CFU, за исключением лунок с анти-комплиментарными контролями, куда добавляют 25 μл VB, чтобы компенсировать нехватку антигена.
- iii) Добавляют 25 μл С' в дозе 2,5 единиц. Аккуратно встряхивают и инкубируют при температуре 37°C в течение 30 минут, периодически (как минимум дважды во время инкубирования) или постоянно встряхивая.
- iv) Добавляют 25 μл HS. Аккуратно встряхивают и инкубируют при температуре 37°C в течение 30 минут. Микропланшеты необходимо дважды встряхнуть во время процесса инкубирования.
- v) Необходимо установить следующие контроли:
 - a) С': 0,5 единиц, 1 единица и 2,5 единицы.
 - b) HS: 75 μл VB +25 μл HS.
 - c) Антиген: 25 μл 2 CFU антигена + 25 μл С' в 2,5 единиц + 25 μл HS= 25 μл VB.

Данные контроли вместе с положительной контрольной сывороткой (PRS) и отрицательной контрольной сывороткой (NRS) необходимо всегда использовать на каждом микропланшете или на серии микропланшетов, где используются одинаковые партии реагентов.

vi) *Интерпретация результатов*

После центрифугирования планшетов в режиме 125 g в течение 5 минут, анализ проводят на основании процента наблюдаемого связывания комплемента.

Положительный результат: 100% связывания при 1/10;

Сомнительные результаты: 25, 50 или 75% связывания при 1/10.

vii) *Валидация результатов*

Ожидаемые результаты для контроля планшета:

- a) PRS: ожидаемый титр.
- b) NRS: 100% гемолиз

- с) Антикомплиментарный контроль образцов сыворотки: 100% гемолиз
- d) Антигенный контроль: 100% гемолиз
- е) Контроль единицы комплемента: 100% гемолиза для 2,5 единиц
- f) Контроль HS при отсутствии связывания: 0% гемолиз

Рекомендуется, чтобы любой CFT результат, даже частичный (25, 50 или 75%) при разведении сыворотки 1/10 подтверждался с помощью дополнительных исследований, таких как иммуоблоттинг или послеубойный осмотр, а также бактериологическими методами исследованиями, согласно вероятности.

2.2. Конкурентный твердофазный иммуоферментный анализ

Конкурентный ИФА (C-ELISA), разработанный Центром МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных в тропических странах (смотрите Таблицу, представленную в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*) (Le Goff & Thiaucourt, 1998), был валидирован на международном уровне в соответствии со стандартами МЭБ (Amanfu *et al.*, 1998). Данный конкурентный ИФА подходит для сертификации отдельных животных перед их перемещением, в том числе с целью торговли. Рабочие характеристики данного конкурентного ИФА также были валидированы Французским Комитетом по Аккредитации в 2009 году.

Если сравнить конкурентный ИФА с РСК – то он обладает такой же чувствительностью и большей специфичностью. Рекомендации по стандартным протоколам и доступности реагентов можно получить от Референтных лабораторий МЭБ по СВРР или от Центров МЭБ по сотрудничеству в области ИФА и молекулярных техник при диагностировании болезней животных (смотрите Таблицу, представленную в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*).

Валидационные испытания (Amanfu *et al.*, 1998; Le Goff & Thiaucourt, 1998), проведенные в нескольких странах Африки и Европы указывают на то, что: i) реальная зарегистрированная специфичность конкурентного ИФА составляет как минимум 99,9%; ii) чувствительность конкурентного ИФА и РСК одинакова; и iii) с помощью конкурентного ИФА можно очень быстро обнаружить антитела в инфицированном стаде после их обнаружения с помощью РСК, и антитела, обнаруженные с помощью конкурентного ИФА, персистируют в течение более длительного периода времени (Niang *et al.*, 2006).

Чтобы усилить воспроизводимость и ошибкоустойчивость данный конкурентный ИФА представлен сейчас в виде готового тест набора, который содержит все необходимые реагенты, включая предварительно сенсibilизированные планшеты в запечатанной упаковке. Данный набор имеется в продаже и его доступность можно проверить через Референтную лабораторию МЭБ во Франции. Набор был специально разработан таким образом, что он является устойчивым к отклонениям, а также обладает хорошей воспроизводимостью. Сыворотки анализируются в индивидуальных лунках. Субстрат был модифицирован и теперь это ТВМ (тетраметилбензол) в жидком буфере, считывание происходит при длине волны в 450 нм. Сначала цвет субстрата меняется с бледно-зеленого до голубого, а сразу после добавления стоп-раствора становится желтым. Контроль моноклональных антител дает более темный цвет, в то время как контроли сильно положительных сывороток очень светлый. Точка разделения была установлена на уровне 50% и должна действовать для всех стран.

2.3. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг (ИВТ) – иммуноферментный анализ, разработанный для подтверждения сомнительных результатов, полученных в ходе реакции связывания комплемента или конкурентного ИФА. Оценка в полевых условиях указала на более высокую специфичность по сравнению с реакцией связывания комплемента, что позволяет обнаруживать ложно положительные результаты реакции связывания комплемента (Gonçalves *et al.* 1998).

2.3.1. Реагенты

- i) Полоски с антигеном (смотрите Раздел В.2.3.2 ниже)
- ii) *Положительная контрольная сыворотка*: сыворотка, полученная от животного, инфицированного контагиозной плевропневмонией КРС естественным путем, используемая в разведении 1/100 в ИВТ. Данный контроль представляет 50% фиксацию при разведении 1/80 в реакции связывания комплемента и демонстрирует профиль иммуноблоттинга с пятью полосами Mmm специфического антигена массой 110, 98, 95, 62/60 и 48 кДа. Такая сыворотка доступна в Референтной лаборатории МЭБ в Португалии.
- iii) *Буфер для разведения*: фосфатно-буферный раствор (ФБР), pH 7.2, содержащий 0,1% обезжиренное молоко и 0,1% яичный альбумин. Качество обезжиренного молока является критическим фактором, поскольку оно будет влиять на чувствительность реакции. Вместо обычного обезжиренного сухого молока рекомендуется использовать стандартизированное обезжиренное молоко (Gaurivaud & Poumarat, 2012).
- iv) *Конъюгированный с пероксидазой антибычий IgG (H + L цепи)*: он имеется в продаже и должен протитровать предварительное титрование методом "шахматной доски" против положительной контрольной сыворотки, чтобы выбрать соответствующее разведение, при котором четко видно пять специфических линий (Gaurivaud & Poumarat, 2012).
- v) *Субстрат*: субстрат готовят путем добавления 30 мг 4-хлоро-1-нафтола, растворенного в 10 мл метанола, к 50 мл ФБР (pH 7.2) и 30 мкл H₂O₂. Также доступны альтернативные субстраты, такие как BCIP/NTB (5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат, смешанный с хлоридом нитротетразолиевого синего)

2.3.2. Подготовка полосок с антигенами

- i) Штамм, используемый для подготовки антигена является крайне важным фактором. Антиген должен быть приготовлен из исследованного штамма MmmSC, который должен представить пять полос специфического антигена, весом 110, 98, 95, 62/60 и 48 кДа. Антиген – это суспензия клеток Mmm в ФБР с pH 7.2, получаемая в форме 48-часовой культуры.
- ii) Градиент концентрации полиакриламидного геля (5-15%), используемый исторически (Gonçalves *et al.* 1998), не является оптимальным для воспроизводимости вестерн-блоттинга. Использование 7,5% полиакриламидного геля, рекомендуемого Schubert *et al.* (2011) и Gaurivaud & Pumarat (2012), позволяет легко отделить пять антигенных белков и дает хорошую воспроизводимость паттерна между циклами электрофореза.

- iii) Отделенные белки переносят в буфере для блоттинга (20% метанол, 193 мМ глицин, 25 мМ Tris/HCl, pH 8.3) на нитроцеллюлозную мембрану, размером 14×14 см, толщиной 0,45μм при 70 В. Необходимо проверить эффективность и гомогенность переноса. Это можно легко сделать с помощью окрашивающего раствора или наборов, которые позволяют провести обратное окрашивание и изображение блота до использования.
- iv) Ту сторону мембраны, на которой белки подвергались электрофорезу, сушат и маркируют. Нитроцеллюлозную мембрану инкубируют в блокирующем буфере (ФБР, содержащий 5% обезжиренное молоко, 1 М глицин и 1% яичный альбумин) в течение 2 часов при комнатной температуре. После промывания (3 раза по 15 минут) при комнатной температуре в 0,1% (o/o) Tween 20 в ФБР нитроцеллюлозную мембрану промывают в ФБР. Затем мембрану сушат, отрезают одну полоску и исследуют на наличие пяти специфических полос, которые идентифицируют при длине волны 110, 98, 95, 62/60 и 48 кДа.
- v) Нитроцеллюлозную мембрану разрезают на полоски, шириной 0,4 см, и используют для исследования на антитела. Необходимо исследовать каждую партию полосок с положительной и отрицательной референтной сывороткой, чтобы оценить наличие пяти специфических антигенных белков и отсутствие фона. Необходимо тщательно проверять разрешение 95 и 98 кДа белков.

2.3.3. Процедура тестирования

Примечание: Во время процедуры полоски должны быть расположены таким образом, чтобы сторона с антигенами находилась сверху.

- i) Подлежащие тестированию образцы разводят в соотношении 1/3 в буфере для разведения (смотрите Раздел В.2.3.1.iii).
- ii) Каждый образец вместе с положительными и отрицательными контрольными сыворотками помещают на полоски с антигенами и инкубируют при температуре 37°C в течение 2 часов, постоянно помешивая. Затем полоски промывают при комнатной температуре три раза, каждый раз по 15 минут, в 0,1% (o/o) Tween-20 в ФБР, потом промывают еще один раз в ФБР.
- iii) Соответствующее разведение конъюгированного с пероксидазой антибычьего IgG (H + L цепи) инкубируют вместе с полосками в течение 1 часа при комнатной температуре, постоянно перемешивая. Промывают, как описано выше.
- iv) К полоскам добавляют субстрат (смотрите Раздел В.2.3.1.v), оставляют их в темном месте, постоянно помешивая, и периодически проверяют до того момента, когда полосы белка станут видны (максимум 30-40 минут). Реакцию останавливают с помощью дистиллированной воды.
- v) *Анализ результатов:* полоски высушивают и проверяют на наличие в иммуоблотинг профиле IgG пяти антиген-специфических полосок, массой 110, 98, 95, 62/60 и 48 кДа, которые должны быть видны в положительной контрольной сыворотке. Образцы, представляющие аналогичный иммуоблотинг профиль, считаются положительными на контагиозную плевропневмонию КРС.

Примечание: Иммуоблотинг достаточно сложно стандартизировать, так как большое количество факторов может оказывать влияние на итоговую модель полосы (Gaurivaud & Pumarat, 2012). Особого внимания заслуживает этап культивирования *MmmSC*, а также выбранный краситель. У недавних штаммов

MmmSC Европейского происхождения отсутствует полоса 98 кДа. Это может привести к сомнительным результатам при тестировании образцов от животных, инфицированных данными штаммами. Референтная лаборатория МЭБ по контагиозной плевропневмонии КРС в Португалии может по запросу предоставить антигенные полоски, а также положительные и отрицательные контрольные сыворотки.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНЕ

1. Справочные сведения

С начала 20-ого века было описано большое количество вакцин против контагиозной плевропневмонии КРС (т.е. неживые вакцины и гетерологичные вакцины), но ни одна из них не доказала свое действие и экономическую целесообразность. Сегодня те вакцины, которые широко используются в практике, основаны на аттенуированных штаммах *MmmSC*.

В прошлом использовались многие аттенуированные штаммы *MmmSC*, такие как Kh3J или V5, но от них отказались. Сейчас используется два штамма для создания вакцин против контагиозной плевропневмонии КРС: штамм T1/44, естественно мягкий штамм, выделенный в 1951 году Sheriff & Piercy в Танзании (Sheriff & Piercy, 1952), и штамм T1sr (Wesonga & Thiaucourt, 2000; Yaya *et al.*, 1999). 44-ый пассаж штамма T1, называемый T1/44, аттенуировали в достаточной степени, чтобы защитить КРС без тяжелых пост-вакцинальных реакций. Однако, хоть и редко, такие реакции все же могут возникнуть в полевых условиях. Частота их возникновения непредсказуема. Перед проведением массовой вакцинации необходимо оценить породы КРС на их чувствительность. Необходимо отметить, что интубация вакцины может привести к появлению поражений, характерных для контагиозной плевропневмонии КРС (Mbulu *et al.*, 2004); однако, поскольку вакцина должна вводиться подкожно, это не должно вызывать никаких серьезных проблем (Hubschle *et al.*, 2002).

Вакцины из T1/44 и T1sr могут эффективно защищать стада при условии регулярного проведения вакцинации (т.е. раз в год для T1/44 и два раза в год для T1sr). Их можно также использовать для борьбы с контагиозной плевропневмонией КРС в более широком масштабе (на национальном и региональном уровне), однако только проведение вакцинации не приведет к искоренению болезни.

Целевыми видами являются восприимчивые хозяева рода *Bos*.

Новые аттенуированные вакцины должны обладать меньшей вирулентностью, чем T1/44, но при этом обеспечивать такую же или большую длительность иммунитета (1 год) и иммуногенность.

Новые инактивированные вакцины должны индуцировать значительно более долгий иммунитет (>1года), не должны препятствовать обнаружению вспышек контагиозной плевропневмонии КРС и, в идеале, должны быть совместимы с другими антигенами для производства мультивалентных вакцин.

Руководства по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, приведенные здесь в главе 1.1.8, являются общими по своей природе, поскольку производители могут быть обязаны

соответствовать требованиям Европейской фармакопеи, Департамента сельского хозяйства Соединенных Штатов (Америки) или другим национальным и региональным требованиям.

2.Схема производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики посевного материала

В настоящее время для производства вакцины против контагиозной плевропневмонии КРС рекомендуется использование двух аттенуированных штаммов: T1/44 и T1sr. T1/44 аттенуируют путем проведения 44 пассажей мягкого полевого штамма в эмбрионах. Это обеспечивает аттенуацию штамма и сохранение его иммуногенных характеристик. Однако, наблюдается некоторая остаточная вирулентность данного штамма, и процент тест-животных, демонстрирующих реакцию, значительно варьирует в зависимости от региона. Такие реакции обычно наблюдаются у животных, вакцинированных впервые. Также наблюдается снижение иммуногенности при усилении степени аттенуации. Штамм T1sr является прямым дериватом от T1/44. Он становится устойчивым к стрептомицину после четырех серий пассажей в ростовой среде с увеличивающимися концентрациями стрептомицина. Штамм T1sr не обладает остаточной вирулентностью, но индуцирует иммунитет на более короткий период времени (6 месяцев).

Посевной материал, используемый для производства вакцины, должен быть максимально близок к оригинальным вакцинным штаммам. Прородительский исходный запас таких штаммов хранится в Референтной лаборатории МЭБ во Франции, а также в Центре МЭБ по сотрудничеству в сфере контроля качества ветеринарных вакцин в Эфиопии.

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

Рекомендуется культивировать посевной материал в подходящей среде, которая не содержит консервантов, таких как антибиотики, чтобы можно было видеть, что главный посевной материал чист. Исследование на свободу от посторонних веществ проводится в соответствии с международными и/или национальными руководствами. Исследования на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов можно найти в главе 1.1.9.

Чистоту и идентичность посевного материала сложно установить с помощью традиционных микробиологических методов. Стоит отметить, что морфологические аспекты колоний микоплазмы на твердой среде является нетипичными и могут варьировать в зависимости от состава среды (процента сыворотки или агара, например). Кроме того, было отмечено, что посевной материал T1/44 мог давать колонии различных аспектов, возможно, по причине гипервариабельности антигенов. Таким образом, чистоту посевного материала необходимо устанавливать после процедуры фильтрации-клонирования и специфической идентификации как минимум 10 индивидуальных колоний. Штаммы T1 можно идентифицировать с помощью специфической ПЦР (Lorenzon *et al.*, 2000). Клоны T1sr можно дифференцировать от T1/44 по их способности расти при наличии стрептомицина.

2.1.3. Валидация вакцинного штамма

Несмотря на то, что штаммы *MmmSC* можно субтипировать с помощью молекулярных маркеров, до сих пор нет доказательства того, что единичный вакцинный штамм не сможет обеспечить защиту против всех циркулирующих штаммов *MmmSC*.

i) Безвредность

Как было отмечено выше, штамм T1/44 обладает известной остаточной вирулентностью, которая может варьировать в зависимости от местных условий. Поствакцинальные реакции характеризуются локализованной воспалительной реакцией, которая образуется в месте инъекции (реакция Виллема). Ее можно увидеть уже через неделю после инъекции. Во многих случаях данная местная реакция исчезает естественным путем, однако в некоторых случаях она может стать более обширной и, при отсутствии лечения антибиотиками, привести к смерти животного. Поскольку процент животных, у которых может развиваться реакция, непредсказуем – предварительные испытания на нескольких животных не являются гарантом безвредности.

После восстановления двум мышам посевной материал вводят подкожно, двум – внутривентриально, а также двум самцам морской свинки – внутривентриально. Ни одно из животных не должно умереть в течение следующего месяца, а у морских свинок не должно быть признаков орхита. Тест на безвредность должен быть также проведен на КРС и зебу (как минимум на двух). Каждой особи вводят десять вакцинных доз и наблюдают за побочными действиями как минимум в течение 4 недель.

ii) Иммуногенность

Что касается контагиозной плевропневмонии КРС, нет таких восприимчивых лабораторных животных, которые бы позволили легко проводить контроль иммуногенности. Также нет строгой корреляции между титрами антител после вакцинации и фактической защитой. Единственный способ контролировать иммуногенность вакцины – проводить контрольное заражение восприимчивого хозяина путем “контакта”. Была проведена оценка иммуногенности прародительского посевного материала. Первая вакцинация минимальной требуемой дозой дала уровень защиты 40-60%. Более высокие уровни защиты были достигнуты после повторного проведения вакцинации.

2.2. Методы производства

2.2.1. Процедура

Смешанные вакцинные культуры можно получить в результате проведения максимум трех последовательных пассажей посевного материала. Пассаж определяется здесь как разведение культуры 1/100 в экспоненциальной фазе роста. Например, 0,5 мл культуры с посевного материала переносят в 50 мл свежей среды и, когда наблюдается помутнение, эти 50 мл используют для посева в 5000 мл среды, что представляет собой конечный продукт с оптимальным полученным титром. Каждый производитель вакцины должен потом оценить скорость роста вакцинного штамма в среде, которая используется для оптимизации времени сбора урожая.

Перед лиофилизацией к конечным культурам можно добавить стабилизатор. Производитель должен обеспечить равномерное распределение по пробиркам и использование соответствующего лиофилизирующего агента, чтобы по окончании процесса лиофилизации во всех пробирках титры были одинаковыми.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Необходима подходящая стерильная жидкая среда, допускающая рост вакцинного штамма при требуемом титре. Обычно она состоит из “базы”, которую можно автоклавировать, которую потом пополняют для роста микоплазмы. База состоит из мясного переvara. Его можно приготовить самостоятельно или купить в виде порошка (например, сердечно-мозговой экстракт, бульон для PPO, и т.д.). Добавка обычно состоит из сыворотки животного (обычно лошадиная сыворотка в 10% конечной концентрации), свежего дрожжевого экстракта (5-10%) и других ингредиентов, таких как глюкоза, глицерол, ДНК и жирные кислоты. Не существует каких-либо специфических требований к составу среды, однако имеются определенные требования к гарантии того, что все ингредиенты соответствующего качества, как указано в главе 1.1.8, при этом особое внимание уделяется продуктам биологического происхождения, а также любым национальным требованиям.

Обычно не рекомендуется добавлять в среду консерванты, такие как пенициллин или аналогичные антибиотики. Однако, штамм T1sr должен расти в среде, содержащей стрептомицин, чтобы предотвратить реверсию к чувствительности к стрептомицину.

2.2.3. Контроли в ходе производства

Рекомендуется проводить оценку чистоты продукта в ходе производства. Например, чистоту можно быстро оценить перед лиофилизацией с помощью микроскопа при увеличении $\times 40$ с фазово-контрастным просвечиванием. Микоплазмы выглядят, как маленькие серые точки, иногда образующие цепи, обладающие броуновским движением. Классические бактерии больше по размеру и более яркие, иногда обладают заметной подвижностью.

2.2.4. Тестирование конечной партии продукта

i) Стерильность

Тестирование биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации должно проводиться в соответствии с рекомендациями данного Кодекса по наземным животным (глава 1.1.9) или в соответствии с национальными регламентами.

ii) Идентичность

Смотрите Раздел C.2.1.2.

iii) Безопасность

Тесты на безопасность должны проводиться на КРС или зебу (как минимум двух особях). Каждой особи вводят десять вакцинных доз и наблюдают за побочным действием как минимум в течение 4 недель.

iv) Стабильность

Лиофилизированные продукты считаются крайне стабильными при условии хранения при температуре -20°C (т.е. в течение нескольких лет).

Лиофилизированные продукты становятся менее стабильными, если хранятся при температуре 4°C . Стабильность может варьировать по ряду причин, таких как качество пробирок, пробок и процесса лиофилизации. Доказательство того, что продукт обладает необходимым титром в конце срока своей годности является обязанностью производителя.

В этой связи рекомендуется, чтобы остаточная влага продукта не превышала 3%.

v) Иммуногенность партии

Примечание: Исследование производственных партий на иммуногенность не проводится на регулярной основе, поскольку нет таких лабораторных животных, которые бы позволили проведение данного теста при его низкой стоимости. Тесты на иммуногенность на КРС также не проводятся по причине высокой стоимости. Получение статистически значимых уровней защиты потребует использование как минимум 50 ранее не вакцинированных животных.

Иммуногенность конечного продукта обеспечивается за счет использования партии посевного материала известного происхождения, в отношении которой уже был проведен тест на иммуногенность, за счет четкого соблюдения стандартных производственных протоколов (избегание множества пассажей), а также обеспечения правильных конечных титров.

Минимальный титр составляет 10^7 живых микоплазм на вакцинную дозу, однако рекомендуются более высокие титры, поскольку они утрачиваются с момента производства до момента введения животным. Титрование проводят после восстановления лиофилизированной вакцины в растворителе, рекомендуемом для вакцинации, и, желательно, растворителем, предоставляемым производителем вакцины. Титрование следует проводить как минимум на трех пробирках с партии. Такой титр необходимо оценить с помощью методики титрования, которая дает точность $\pm 0,25$ logs. Партия проходит тест, если три пробирки, отобранные в случайном порядке, имеют титры как минимум 10^7 живых микоплазм на вакцинную дозу. Производители должны гарантировать, что их производственный процесс дает однородные партии с минимальными отличиями между пробирками. В таком случае трех пробирок достаточно для оценки титра партии. В противном случае необходимо установить рамки отбора проб, чтобы обеспечить то количество проб, которое было бы достаточно для репрезентации партии вакцины. Производитель должен также обеспечить сохранение минимального титра до истечения срока годности, при условии хранения продукта при правильной температуре.

2.3. Требования к авторизации/регистрации/лицензированию

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины, необходимо предоставить всю релевантную информацию, касающуюся ее производства и контроля качества (смотрите Разделы С.2.2.1 и С.2.2.2), компетентному органу. Такая информация должна быть представлена в отношении трех последовательных партий вакцины, при этом объем не должен составлять меньше 1/3 объема обычной промышленной партии.

Контроль в процессе производства является частью производственного процесса.

2.3.2. Требования к безопасности

- i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Необходимо удостовериться в безопасности только для целевых животных (т.е. род *Bos*).

- ii) Реверсия к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин и учёт воздействия на окружающую среду

Известно, что штаммы T1/44 индуцирует поствакцинальные реакции у некоторых животных, вакцинированных впервые. Соответствующие предупреждения должны быть включены в инструкцию по применению вакцины, включая рекомендуемое лечение антибиотиками, которое необходимо провести. Локальные подкожные реакции не должны расцениваться как опасность для интактных животных, поскольку обычно выделения вируса не происходит. Однако, при отсутствии надежных данных необходимо осуществлять надзор за стадами КРС, в которых наблюдались поствакцинальные реакции.

- iii) Противопоказания (опасности)

Вакцины против контагиозной плевропневмонии КРС, основанные на штаммах T1/44 и T1sr, удовлетворяющие контролю качества, являются безопасными для человека.

2.3.3. Требования к эффективности

По причине очень высокой стоимости тестирования на эффективность вакцины на КРС необходимы только косвенные гарантии. Производители вакцин должны гарантировать, что каждая партия была произведена из референтного прародительского посевного материала известного происхождения и с известными характеристиками, что она произведена с соблюдением принципов надлежащей производственной практики, а именно что конечный продукт не был получен в результате процедур, которые могли индуцировать смещение от оригинального посевного материала.

Также необходимо напомнить, что полная защита стад КРС достигается только после повторной вакцинации.

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

Не применимо к имеющимся вакцинам против контагиозной плевропневмонии КРС

2.3.5. Продолжительность иммунитета

Не требуется для имеющихся вакцин против контагиозной плевропневмонии КРС.

2.3.6. Стабильность

Один из этапов регистрации/лицензирования предполагает, что производителя могут попросить продемонстрировать стабильность титра вакцины в конце ее заявленного срока годности. Для лиофилизированного продукта, а также конечного продукта после восстановления в соответствующих разбавителях, должна быть указана температура хранения. Также должно иметься предупреждение о порче продукта в случае несоблюдения температурного режима хранения вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AMANFU W., SEDIADIE S., MASUPU K.V., BENKIRANE A., GEIGER R. & THIAUCOURT F. (1998). Field validation of a competitive ELISA for the detection of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 51, 189–193.

BASHIRUDDIN J. B., NICHOLAS R. A. J., SANTINI F. G., READY R. A., WOODWARD M.J. & TAYLOR T. K. (1994). Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma* DNA in cattle with contagious pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, 134, 240–241.

BELLINI S., GIOVANNINI A., DI FRANCESCO C., TITTARELLI M. & CAPORALE V. (1998). Sensitivity and specificity of serological and bacteriological tests for contagious bovine pleuropneumonia. *Rev. sci. tech. OIE Int. Epiz.* 17, (3), 654–659.

BROCCHI E., GAMBA D., POUMARAT F., MARTEL J.L. & DE SIMONE F. (1993). Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 12, 559–570.

DEDIEU L., MADY V. & LEFEVRE P.C. (1994). Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet. Microbiol.*, 42, 327–339.

EUROPEAN COMMISSION (2001). Health & Consumer Protection Directorate-General. Diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Adopted 17 October 2001. SANCO/AH/R25/2001.

FREUNDT E.A., ERNO H. & LEMCKE R.M. (1979). Identification of mycoplasmas. In: *Methods in Microbiology*, Vol. 13, Bergen T. & Norris J.R., eds. Academic Press, London, UK, 377–434.

GAURIVAUD P. & POUMARAT F. (2012). Serodiagnosis of contagious bovine pleuropneumonia by immunoblotting. Euroreference, winter 2012, N°8, <http://www.ansespro.fr/euroreference/Documents/ER08-Meth-PeripneumoEN.pdf>

GONÇALVES R., REGALLA J., NICOLET J., FREY J., NICHOLAS R., BASHIRUDDIN J., DE SANTIS P. & PENHA GONÇALVES A. (1998). Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Vet. Microbiol.*, 63, 13–28.

- HUBSCHLE O., LELLI R., FREY J. & NICHOLAS R.A.J. (2002). Contagious bovine pleuropneumonia and vaccine strain T1/44. *Vet. Rec.*, 150, 615.
- ISO/IEC (2005). ISO/IEC 17025:2005. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. International Organization for Standardization (ISO), www.iso.org.
- LE GOFF C. & THIAUCOURT F. (1998). A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet. Microbiol.*, 60, 179–191.
- LORENZON S., DAVID A., NADEW M., WESONGA H. & THIAUCOURT F. (2000). Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Mol. Cell. Probes*, 14, 205–210.
- LORENZON S., MANSO-SILVÁN L. & THIAUCOURT F. (2008). Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol. Cell. Probes*, 22 (5-6), 324–328.
- MANSO-SILVÁN L., VILEI E.M., SACHSE K., DJORDJEVIC S.P., THIAUCOURT F. & FREY J. (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59 (Pt 6), 1353–1358.
- MBULU R.S., TJIPURA-ZAIRE G., LELLI R., FREY J., PILO P., VILEI E.M., METTLER F., NICHOLAS R.A. & HUEBSCHLE O.J. (2004). Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.*, 98, 229–234.
- MILES K., CHURCHWARD C.P., MCAULIFFE L., AYLING R.D. & NICHOLAS R.A. (2006). Identification and differentiation of European and African/Australian strains of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small-colony type using polymerase chain reaction analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18, 168–171.
- MISEREZ R., PILLOUD T., CHENG., NICOLET J., GRIOT C. & FREY J. (1997). Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Mol. Cell. Probe*, 11, 103–111.
- NIANG M., DIALLO M., Cisse O., KONE M., DOUCOURE M., ROTH J.A., BALCER-RODRIGUES V. & DEDIEU L. (2006). Pulmonary and serum antibody responses elicited in zebu cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by contact exposure. *Vet. Res.*, 37, 733–744.
- PROVOST A. (1972). Recherches immunologiques sur la péripneumonie. XIV. Description de deux techniques applicables sur le terrain pour le diagnostic de la maladie. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 25, 475–496.
- PROVOST A., PERREAU P., BREARD A., LE GOFF C., MARTEL J.L. & COTTEW G.S. (1987). Péripneumonie contagieuse bovine. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 6, 565–624.
- SANTINI F.G., VISAGGIO M., FARINELLI G., DI FRANCESCO G., GUARDUCCI M., D'ANGELO A.R., SCACCHIA M. & DI GIANNATALE E. (1992). Pulmonary sequestrum

from *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* SC in a domestic buffalo; isolation, anatomo-histopathology and immuno-histochemistry. *Veterinaria Italiana*, 4, 4–10.

SCHUBERT E., SACHSE K., JORES J. & HELLER M. (2011). Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. *BMC Vet. Res.*, 7, 72.

SHERIFF D. & PIERCY S.E. (1952). Experiments with an avianised strain of the organism of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, 64, 615–621.

SRIVASTAVA N.C., THIAUCOURT F., SINGH V.P., SUNDER J. & SINGH V.P. (2000). Isolation of *Mycoplasma mycoides* small colony type from contagious caprine pleuropneumonia in India. *Vet. Rec.*, 147, 520–521.

WESONGA H.O. & THIAUCOURT F. (2000). Experimental studies on the efficacy of T1sr and T1/44 vaccine strains of MmmSC against a field isolate causing contagious bovine pleuropneumonia in Kenya – Effect of a revaccination. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 53, 313–318.

YAYA A., GOLSIA R., HAMADOU B., AMARO A. & THIAUCOURT F. (1999). Essai comparatif d'efficacité des deux souches vaccinales T1/44 et T1sr contre la péripneumonie contagieuse bovine. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 52, 171–179.

*