

РАЗДЕЛ 3.6

ЗАЙЦЕОБРАЗНЫЕ

ГЛАВА 3.6.1.

МИКСОМАТОЗ

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: Миксоматоз это смертельное, генерализованное заболевание европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*), вызываемое вирусом миксомы (МУХV), относящимся к семейству поксвирусов (Poxviridae). Естественными переносчиками являются два представителя зайцеобразных: *Sylvilagus brasiliensis* в Южной Америке (южноамериканские итамы) и *S. bachmani* (калифорнийские итамы) в Калифорнии (США). Однако после того, как вирус миксомы был целенаправленно завезен в Австралию и в Европу в качестве биологического средства контроля численности дикого европейского кролика, МУХV получил повсеместное распространение, в настоящее время широко встречается в популяциях европейского кролика и может наблюдаться у кроликов, выращиваемых на фермах, у лабораторных кроликов, и у кроликов, содержащихся в качестве домашних животных. На данный момент миксоматоз по-прежнему представляет собой основную инфекцию, угрожающую кролиководству.

Описание болезни: Миксоматоз в значительной степени является заболеванием европейских кроликов. Заяц-русак (*Lepus europaeus*) восприимчив к вирусу миксоматоза, но генерализованная форма заболевания развивается редко. *Sylvilagus spp.* устойчивы к данной инфекции и могут рассматриваться в качестве здоровых переносчиков. Заболевание не представляет риска для здоровья человека. У кроликов наблюдаются две формы заболевания: узелковая (классическая) форма, характеризующаяся обширными миксомными поражениями кожи, и немиксомная (респираторная) форма, при которой

проявления носят, в основном, респираторный характер, а узелки на коже небольшие и немногочисленные. Узелковая форма вызывается вирулентными штаммами МУХУ, которые в естественных условиях переносятся жалящими насекомыми, главным образом, в летний период. Данная форма встречается, в основном, у диких и домашних кроликов, а также в небольших кролиководческих хозяйствах. В ходе заражения вирусом миксомы многочисленные иммуномодулирующие белки постепенно вызывают разрушение иммунной системы хозяина. Это способствует развитию в дыхательных путях животного бактериальных инфекций, что играет существенную роль в гибели животного. С момента внедрения вируса МУХУ в популяции кроликов возникли и циркулируют штаммы вируса миксомы, имеющие различную степень патогенности. Слабопатогенные и ослабленные штаммы вызывают немиксомную (респираторную) форму заболевания, главным образом, у животных, содержащихся на фермах. Дикие кролики действуют как резервуары, а москиты и блохи могут переносить вирус на домашних кроликов, но в случае большой скученности кроликов (например, в фермерских хозяйствах) вирус может передаваться также путем прямого контакта. Вводимая семенная жидкость также может представлять риск. Возрастная или гендерная предрасположенность отсутствует.

Идентификация возбудителя: диагноз «миксоматоз», независимо от клинической формы заболевания, зависит от выделения и идентификации вируса или обнаружения антигенов к нему. В случае, когда на павшей особи имеются поражения кожи, специфический вирусный антиген может быть обнаружен несколькими методами экспресс-диагностики, например, методом иммунодиффузии в агаровом геле (AGID), методом электронной микроскопии негативно окрашенных препаратов (nsEM), реакцией иммунофлуоресценции (РИФ), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также при помощи гистопатологического анализа. Инокуляция материала из пораженных участков в однослойные культуры клеток почки кролика позволяет наблюдать характерные цитопатические эффекты поксвирусов. Наличие вируса может быть подтверждено посредством иммунопероксидазного однослойного анализа, РИФ, ПЦР и nsEM.

Серологические исследования: наличие выраженного гуморального иммунного ответа облегчает ретроспективный диагноз заболевания и может служить индикатором распространенности инфекции в популяции кроликов. Серология может быть использована также для оценки эффективности вакцинации, даже если отсутствует прямая корреляция между титрами антител к вирусу МУХУ и степенью защиты животных от данного заболевания. Идентификация и титрование специфических антител, появление которых обусловлено естественным инфицированием или иммунизацией, осуществляется, главным образом, путем иммуноферментного анализа. РИФ и AGID также могут быть использованы для данной цели, но они имеют меньшую чувствительность.

Требования к вакцинам: для иммунизации кроликов имеются вакцины с модифицированным живым вирусом, произведенные с использованием вируса фибромы или модифицированных штаммов вируса миксомы.

А. ВВЕДЕНИЕ

Миксоматоз это основное вирусное заболевание дикого и домашнего европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*), вызываемое вирусом миксомы (МУХV) - поксвирусом (семейство *Poxviridae*; подсемейство *Chordopoxvirinae*; род *Leporipoxvirus*), впервые выделенным в колонии лабораторных кроликов в Уругвае в 1898 году. ДНК вируса миксомы содержит около 170 генов, среди которых примерно 70 кодируют иммуномодулирующие и взаимодействующие с организмом хозяина факторы, вызывающие нарушение работы иммунной системы хозяина и иные виды противовирусного ответа.

Естественными переносчиками являются два представителя зайцеобразных: *Sylvilagus brasiliensis* в Южной Америке (южноамериканские штаммы) и *S. bachmani* (калифорнийские штаммы) в Калифорнии, США (Fenner, 1994); у них штаммы вируса вызывают лишь образование доброкачественной фибромы. Вследствие преднамеренной интродукции в Австралию и Европу с целью биологического контроля численности диких европейских кроликов вирус миксомы сегодня повсеместно распространен, в настоящее время широко встречается в популяциях европейского кролика и может наблюдаться у кроликов, выращиваемых на фермах, у лабораторных кроликов, и у кроликов, содержащихся в качестве домашних животных (Fenner & Fantini, 1999). В редких случаях генерализованная форма заболевания может встречаться у зайца-русака (Fenner & Ratcliffe, 1965). Резервуаром заболевания служат дикие кролики, а насекомые (главным образом, москиты и блохи, но также мошки и вши) могут переносить вирус на домашних кроликов. В случае большой скученности кроликов (например, в фермерских хозяйствах) вирус может передаваться путем прямого контакта. МУХV выделяется из глазного и назального секрета и из тканей пораженных участков кожи, он также может присутствовать в семенной жидкости и выделениях половых органов. Возрастная или гендерная предрасположенность отсутствует.

Известны две формы заболевания: узелковая (классическая) и немиксомная (респираторная). Узелковая форма миксоматоза в естественных условиях передается при посредстве жалящих насекомых и наблюдается, главным образом, у диких и домашних кроликов, а также в небольших кролиководческих хозяйствах. Она характеризуется выраженными поражениями кожи и тяжелой дисфункцией иммунной системы, сопровождающейся, как следствие, развитием бактериальных инфекций респираторного тракта. Установлены прототипные штаммы вируса, восходящие к возбудителям австралийской и европейской эпидемий; указанные штаммы характеризуются различной степенью вирулентности (от I до V), определенной на лабораторных кроликах (Fenner & Ratcliffe, 1965). После инфицирования штаммом I степени вирулентности (наибольшая вирулентность) первым признаком инфекции является вздутие в месте инфицирования, которое увеличивается в размере, обычно становится сильно выпуклым и изъязвляется. Постепенно развиваются острый блефароконъюнктивит и отечность в области гениталий. Вторичные поражения кожи появляются примерно на шестой-седьмой день (Fenner, 1994). Гибель животного наступает, как правило, на восьмой-пятнадцатый день после заражения. После инфицирования штаммами II - V степени вирулентности клинические признаки, в целом, аналогичны, но развиваются медленнее и носят менее тяжелый характер. Если животное выживает, поражения постепенно исчезают. Уровень смертности колеблется от 20 до 100% в зависимости от степени вирулентности штамма вируса. У кроликов, все еще

остающихся в живых через 10-14 дней после инфицирования, обычно развиваются вторичные бактериальные инфекции (в частности, *Pasteurella* sp. и *Bordetella* sp.) конъюнктивы, верхних дыхательных путей и легких, которые могут стать основной причиной смерти животных, инфицированных штаммами МУХV, вызывающими подострое течение болезни.

Клинические признаки немиксомной формы заболевания носят, главным образом, респираторный характер: поражения кожи не так многочисленны и меньше по размеру, чем при нодулярной форме заболевания, хотя присутствуют многие типичные клинические признаки миксоматоза, например, поражение кожи в области введения возбудителя, отек промежности, набухание век, блефароконъюнктивит и ринит. Данная форма заболевания считается более значимой для животных, выращиваемых на фермах. Генетическая основа немиксомного фенотипа пока не определена, но выдвинуто предположение, что немиксомная форма представляет собой адаптацию к контактному механизму передачи инфекции в отсутствие переносчиков инфекции, предположительно, респираторным путем и через конъюнктивальный секрет, поскольку для заражения необходим непосредственный контакт. Вирулентность возбудителей немиксомной формы, по-видимому, зависит от присутствия бактериальных патогенов, таких как *Pasturella multocida* (Marlier *et al.*, 2000). На сегодняшний день данная форма заболевания часто встречается в европейских странах, имеющих существенные объемы производства кроличьего мяса (например, Франция, Испания, Бельгия, Италия).

Случаи заражения человека вирусом МУХV неизвестны. Посредством анализа рисков должны быть определены меры по обеспечению биобезопасности, как изложено в главе 1.1.4. *Биобезопасность и биозащита: стандарт контроля биологической опасности в ветеринарной лаборатории и вивариях.*

Клинические симптомы классического миксоматоза достаточно отчетливо выражены, хотя бактериальные инфекции верхних дыхательных путей и бактериальный конъюнктивит/кератоконъюнктивит могут вводить в заблуждение и приводить к неверной постановке диагноза. Вирус фибромы Шоупа (SFV) вызывает простое фиброматозное локальное поражение, которое следует отличать от поражений, вызываемых МУХV.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Поскольку выраженность симптомов заболевания снижается с ослаблением вирулентности штаммов вируса, передача образцов в лабораторию для постановки диагноза приобретает все большую важность. Более того, при немиксомной форме заболевания снижается выраженность эктодермотропизма, поэтому постановка клинического диагноза для немиксомной формы, очевидно, более сложна, чем в случае классической формы заболевания. Существующие методы различны и позволяют определить наличие вируса МУХV в типичных миксомных поражениях, отеках век или области гениталий. Тем не менее, для диагностики ослабленной типичной или атипичной (немиксомной) форм заболевания может потребоваться выделение вируса путем инокуляции чувствительных клеточных линий, например, RK-13 (клетки почек кролика), и идентификации вируса иммунологическими методами. В обоих случаях возбудитель может быть также быстрее и легче идентифицирован путем выявления нуклеиновой кислоты вируса миксомы. Применение молекулярных методов в диагностике в последние годы неуклонно возрастало. Эти методы позволяют выявить наличие бессимптомной инфекции (например, путем

анализа мазков конъюнктивального секрета) и дифференцировать вакцинированных животных от инфицированных дикими полевыми штаммами вируса (Cavadini *et al.*, 2011).

Таблица 1: Существующие методы анализа и их назначение

Метод	Назначение					
	Отсутствие вируса в популяции	Отсутствие вируса у отдельного животного перед перемещением	Роль в программах борьбы с заболеванием	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции (эпиднадзор)	Иммунный статус отдельного животного или популяции (после вакцинации)
Идентификация возбудителя¹						
nsEM	–	–	–	++	–	–
Гистопатология и иммуноокрашивание	–	–	–	++	–	–
Выделение вируса (культура клеток)	–	+	–	+++	–	–
AGID	+	+	+	–	–	–
РИФ	+	++	–	+	–	–
IPMA	+	+	–	++	–	–
ПЦР	+	+++	++	++	–	–
	+					
Выявление иммунного ответа						
Н-ИФА	++	+++	++ +	++	+++	+++
К-ИФА	++	+++	++ +	++	+++	+++
РНИФ	+	+	+	–	++	++
AGID	+	+	+	–	+	++

Условные обозначения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = пригодный метод; + = возможно использование в некоторых случаях, но затраты, надежность или иные факторы существенно ограничивают его применение; – = неприменим для данной цели.

Несмотря на то, что не все методы, перечисленные в категориях +++ и ++ прошли официальную валидацию, установившаяся практика их использования, а также тот факт, что они широко применяются, не давая при этом сомнительных результатов, определяют их приемлемость.

nsEM = электронная микроскопия негативно окрашенных препаратов; AGID =

¹ Рекомендуется применение комбинации различных методов идентификации возбудителя для исследования одной и той же клинической пробы

иммунодиффузия в геле агара; РИФ = реакция иммунофлуоресценции; IPMA = иммунопероксидазный монослойный анализ; ПЦР = метод полимеразной цепной реакции; ИФА = иммуноферментный анализ (Н = непрямой; К = конкурентный); РНИФ = реакция непрямой иммунофлуоресценции.

1. Идентификация возбудителя

В случае классической формы заболевания идентификация МУХV может производиться с использованием образцов поражений кожи (миксома), век, слизистой гениталий и внутренних органов (легких, печени, селезенки, почек, и т.д.). Миксомы иссекают ножницами и освобождают от эпидермиса и поверхностного слоя дермы. Образцы тканей (ткани узелков и кожи, участки органов и соскобы слизистой) промывают фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) с антибиотиками, как указано ниже, и подвергают измельчению или механической гомогенизации при норме разбавления, составляющей 1 г ткани на 4,5–9,0 мл фосфатно-солевого буферного раствора или стерильной дистиллированной воды (дН₂O). Клетки разрушают посредством двух циклов заморозания-оттаивания или путем ультразвуковой обработки с целью высвобождения вирионов и вирус-специфических антигенов. Полученную суспензию центрифугируют в течение 5-10 мин при 1500 g. Надосадочную жидкость используют для проведения анализа.

В случае немиксомной респираторной формы заболевания для идентификации вируса могут быть взяты мазки назального и конъюнктивального секрета. Тампоны, содержащие образцы секрета, помещают в пробирку, содержащую примерно 0,3 мл стерильной дистиллированной воды, и вымачивают в течение 10–15 минут, остатки образца соскабливают с ватного тампона непосредственно в дистиллированную воду деревянным аппликатором.

1.1. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия негативно окрашенных препаратов (nsEM) может применяться для исследования участка поражения кожи (миксома), век, слизистой гениталий, а также конъюнктивальных и назальных мазков и легких. Методика выполнения анализа (капельный метод) проста и не требует большого количества времени: результат известен уже через 1 час.

Каплю суспензии, полученной из образца ткани, помещают на предметное стекло, накрывают медной сеткой 200/400 меш с пластиковой/ угольной подложкой и оставляют для абсорбции на 10 минут. Излишки жидкости затем удаляют при помощи фильтровальной бумаги и сетку помещают на каплю красителя приблизительно на 30 секунд. Для окрашивания используется 2% водный раствор молибдата аммония (pH 7,0) или 2% фосфорновольфрамная кислота (pH 7,0). Излишки жидкости удаляют при помощи фильтровальной бумаги, и сетка готова к установке в микроскоп. При наличии возбудителя в исследуемом материале можно наблюдать типичные частицы поксвируса, но данный метод не позволяет отличить вирус миксома от вируса фибромы Шоупа.

1.2. Гистопатологический анализ

Гистопатологическое исследование поражений кожи, зафиксированных в 10% забуференном формалине и заключенных в парафин, показывает, что крупные узлы образуются в коже,

главным образом, вследствие отложения муцина и разрушения структуры соединительной ткани в дерме, а не в результате интенсивного роста клеток (Marcato & Rosmini, 1986). В дерме и эпидермисе появляется большое количество гранулоцитов и укрупненных, звездообразных, ретикулоэндотелиальных клеток с крупными ядрами и большим количеством цитоплазмы, которые называются клетками миксомы. Эти клетки вызывают разрушение эндотелия малых сосудов, что приводит к выходу из сосудов эритроцитов. Они также размножаются в селезенке и лимфатических узлах, вызывая полную потерю лимфоцитов как в бурсазависимой, так и в тимусзависимой зонах. По окончании вирусемической фазы вирус распространяется по всему организму и вызывает поражения гениталий и внутренних органов, в основном, застойного характера с повреждением сосудов. В легких поражения имеют различную интенсивность; характерные эпидермальные поражения наблюдаются также в эпителии бронхов (Joubert, 1973). Микроскопические поражения могут варьировать в зависимости от вирулентности штамма и типа животного, например, у диких и лабораторных кроликов (Best *et al.*, 2000).

Зафиксированные ткани могут также подвергаться иммунному окрашиванию с использованием комплекса авидин-биотин-пероксидаза (АВС). Срезы сначала депарафинируют в ксилоле или спирте, подвергают контр-окрашиванию гематоксилином в течение 1 минуты и ополаскивают водопроводной водой. Затем их помещают в ванночку с метанолом, содержащую 3% H₂O₂, и трижды промывают в фосфатно-буферном солевом растворе, каждый раз в течение 5 минут. Для уменьшения фоновых помех, вызываемых неспецифическим связыванием антител, образцы перед добавлением биотина инкубируют с сывороткой здоровых кроликов в течение 1 часа при комнатной температуре. Препараты инкубируют в течение ночи в камере влажности при комнатной температуре с биотинилированной противомиксоматозной сывороткой или моноклональными антителами, промывают, как описано выше, и вновь инкубируют в течение 30 минут при 37°C с авидин-биотин-пероксидазой. Затем препараты трижды промывают. В качестве субстрата используют аминоэтилкарбазол. В завершение препараты ополаскивают водопроводной водой и исследуют.

1.3. Культура *in-vitro* (клеточная культура)

Изоляция вируса в клеточной культуре может производиться с использованием первичных культур клеток почек кролика (RK) или устойчивых клеточных линий, например, RK-13 и SIRC (роговица кролика, Государственный институт сыворотки, Дания), а также иных клеточных линий млекопитающих, например, Vero (почки африканской зеленой мартышки) и BGMK (почки зеленой мартышки буффало), в минимальной поддерживающей среде (MEM), состоящей из 2% телячьей сыворотки, пенициллина (300 МЕ (международных единиц)/мл), стрептомицина (300 мкг/мл), гентамицина (100 мкг/мл), нистатина (микостатина) (50 МЕ/мл); и амфотерицина (фунгизона) (5 мкг/мл). Инокулят состоит из надосадочной жидкости, полученной из гомогенизированного материала, или окулореспираторного секрета (включая конъюнктивальный мазок, подготовленный согласно приведенному выше описанию) в MEM, содержащей 2% телячью сыворотку и антибиотики. По истечении 2 часов его удаляют из клеточного слоя. Клеточный слой промывают в небольшом количестве среды, затем объем поддерживающей среды (MEM) восполняют. Культуры инкубируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Цитопатический эффект, типичный для поксвирусов (Joubert, 1973), обычно наблюдается через 24–48 часов, но для некоторых штаммов, в зависимости от их вирулентности, развитие цитопатического эффекта занимает до 7 дней. В зависимости от вирусного штамма, группы клеток со сливающейся

Ветеринарно-санитарный кодекс МЭБ по наземным животным

цитоплазмой формируют синцитий различного размера, содержащий от 2 до 50 или даже 100 ядер. Ядра некоторых клеток трансформируются, при этом хроматин формирует базофильные агрегации различного размера и численности, придающие культуре клеток сходство с мехом леопарда. Эозинофильные внутрицитоплазматические включения остаются дискретными, если вообще присутствуют. Пораженные клетки округляются, сжимаются и становятся пикнотическими. Затем они разрушаются и отделяются от стеклянной или пластиковой подложки. Позднее поражаются все клетки культуры и клеточный монослой полностью отделяется.

Вirus фибромы Шоупа сначала вызывает образование хорошо выраженных, обширных масс округлых клеток, которые пролиферируют и нагромождаются друг на друга (Joubert, 1973). По краям, в только что инфицированных клетках наблюдаются дискретные изменения ядер и появление ацидофильных цитоплазматических включений, многочисленных на ранних стадиях процесса. Клеточный слой разрушается через несколько дней.

Помимо обнаружения цитопатического эффекта, для подтверждения выделения вируса на культуре клеток могут быть использованы другие методы, включая nsEM (см. раздел В.1.1), РИФ (см. раздел В.1.5.2), IPMA (см. раздел В.1.5.4) и ПЦР (см. раздел В.1.6).

1.4. Культура *in-vivo*

1.4.1. Оплодотворенные яйца

Культивирование вируса миксомы (MYXV) и вируса фибромы Шоупа (SFV) может осуществляться на хориоаллантоисной оболочке оплодотворенных куриных яиц. Вирус инокулируют в аллантоисную полость одиннадцатидневных яиц, которые инкубируют при 35°C в течении трех дней. Мембрану удаляют и промывают. В случае развития вируса под микроскопом могут наблюдаться характерные пустулы.

1.4.2. Инокуляция животным

Инокуляция кроликам внутрикожно не рекомендуется в качестве диагностического метода. Однако она может быть использована, при необходимости, для характеристики патогенности (степени вирулентности классической или немиксомной форм) или для дифференциации SFV и MYXV. Кролики должны быть домашней породы, весом примерно 2 кг., невакцинированные и предварительно проверенные на отсутствие антител (Joubert, 1973).

Инокулятом может служить надосадочная жидкость, полученная в результате гомогенизации пораженных тканей (с антибиотиками), или продукт клеточной культуры. Внутрикожно вводят 0,1 – 0,2 мл за ухом или в поясничную область, с предварительным удалением волосяного покрова в месте введения. Анализ инокулята может осуществляться путем инъекции серийных разведений в солевом буфере в разные участки (по одному участку для каждого разведения). В местах введения в течение 2-5 дней появляется первичное поражение, после чего развивается конъюнктивит. Использование пяти участков для каждого разведения позволяет установить среднюю инфицирующую дозу (ID₅₀). Если животное выживает, заболевание может быть подтверждено серологическим исследованием после 15 дней.

1.5. Обнаружение антигена – методы иммуномечения

1.5.1. Иммунодиффузия в агаровом геле

Иммунодиффузия в геле агара (AGID) (Sobey *et al.*, 1966) является качественным методом, позволяющим обнаруживать присутствие антител или антигенов. Методика выполнения тестов AGID проста; результат становится известен в течение 24 часов. Для изготовления агаровых пластинок используются нобль-агар (0,6 г), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) (2,5 г), хлорид натрия (4,5 г) и дистиллированная вода (500 мл), содержащая тиомерсал (мертиолят) в разбавлении 1/100 000. Стандартная антисыворотка (см. ниже 2с) и тестируемый образец помещаются в противоположные лунки диаметром 6 мм каждая, расположенные на расстоянии 5 мм друг от друга. Другой метод состоит в помещении небольшого количества пораженного материала непосредственно в агар на расстоянии 5 мм от диска из фильтровальной бумаги, пропитанного антисывороткой. В течение 48 часов появляется ряд линий преципитации (обычно до трех), обозначающих наличие антигенов вируса миксомы. В случае гетерологических реакций с SFV формируется только одна линия.

1.5.2. Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)

Срезы из замороженных тканей, фиксированные метанолом, могут напрямую подвергаться иммуноокрашиванию путем инкубирования в течение 1 часа либо с сывороткой против вируса миксомы, конъюгированной с флуоресцеином, либо с моноклональными антителами. Характерная флуоресценция может обнаруживаться в образцах кожных поражений, век, легких, селезенки, печени, почек или слизистой гениталий. Описана прямая реакция иммунофлуоресценции (DIF) *in-vivo*, проведенная на отпечатках клеток роговицы, век и конъюнктивы (DIF-ET) (Cancellotti *et al.*, 1986). DIF-ET выполняется посредством аккуратного прижатия предметного стекла к поверхности глаза. В результате на стекле остаются клетки роговицы, век и конъюнктивы, которые подвергаются окрашиванию и исследованию.

1.5.3. Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)

Реакция непрямой иммунофлуоресценции антител применима к культурам по прошествии 24 часов. РНИФ позволяет обнаружить внутрицитоплазматическое размножение вируса, но не позволяет дифференцировать МУХV и SFV. Инокуляция клеток куриных эмбрионов (обработанных трипсином на 11 день инкубации яиц) не приводит к развитию цитопатического эффекта, но применяется для обнаружения вирус-специфических антигенов при помощи РНИФ.

1.5.4. Иммунопероксидазный монослойный анализ (IPMA)

Данный метод может применяться для выявления клеток, инфицированных вирусом миксомы (МУХV). Производится посев клеток линии RK-13 на шестилуночный планшет (см. раздел 2.1.1.ii). Когда клетки готовы, вносят образцы, по одному в каждую лунку, и планшет инкубируют в соответствии с описанием, изложенным в разделе В.2.3.1. В течение 5-10 минут осуществляется фиксация клеток раствором холодного 80% ацетона, затем производится воздушная сушка. Клетки инкубируют в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,3% H₂O₂ в течение 10 минут при комнатной температуре для подавления активности эндогенной пероксидазы. Дважды промывают в фосфатно-солевом буфере, каждый раз по 5 минут. Инкубируют 1 час при 37°C с предварительно титрованной противомиксоматозной кроличьей сывороткой или специфическими моноклональными антителами в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% БСА (BSA, бычий сывороточный альбумин). Промывают в фосфатно-солевом буфере 3 раза, по 5 минут каждый. Инкубируют

в течение 1 часа при 37°C с предварительно титрованным конъюгатом IgG к кроличьим (или мышинным) IgG с пероксидазой хрена. Промывают в фосфатно-солевом буфере 3 раза, по 5 минут каждый. Окрашивают раствором диаминобензидина (DAB) (0,05% DAB, 50 мм Tris/HCl pH 7,4; 0,01% H₂O₂ (свежеприготовленный)) 10 минут при комнатной температуре. Промывают проточной водопроводной водой в течение 3 минут. Под инвертированным микроскопом четко видны окрашенные в коричневый цвет инфицированные клетки.

1.6 Молекулярные методы – обнаружение нуклеиновых кислот

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Cavadini *et al.*, 2010) или ПЦР в реальном времени (Albini *et al.*, 2012; Belsham *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2013) может применяться для амплификации фрагментов генома МУХВ в диагностируемом материале, включая миксомы век, ушей и носа, струпы и/или поражения легких, назальные и конъюнктивальные мазки или семенную жидкость.

ПЦР и ПЦР-ПДФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) могут быть использованы также для обнаружения вакцинных штаммов (штамм Borghi и штаммы SG33) (Camus-Bouclainville *et al.*, 2011; Cavadini *et al.*, 2010).

Очистка всей ДНК является обязательным условием достижения оптимальной чувствительности. Для данного исследования могут использоваться различные методы очистки. Для минимизации риска загрязнения исследуемого материала следует принимать особые меры предосторожности на всех этапах исследования.

Изложенный ниже порядок проведения исследований является модификацией методик, предложенных Кавадини и соавторами (Cavadini *et al.* (2010)). Анализ методом ПЦР состоит из трех последовательных процедур: (1) экстракция ДНК из исследуемого или контрольного образца, за которой следуют (2) ПЦР-амплификация и (3) определение продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле.

1.6.1. Экстракция вирусной ДНК

- i) Гомогенизируют ~1 г образца (миксомы век, ушей и носа, струпы и/или поражения легких) в 9 мл фосфатно-солевого буфера (PBS1X) при помощи ручного или электрического гомогенизатора в течение 15 минут при 4°C на низкой скорости ~2000 g.
- ii) 100 мкл надосадочной жидкости добавляют в 100 мкл лизирующего буфера (50 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM Na₂-EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% додецилсульфат натрия [SDS]), добавляют 12 мкл протеиназы К (исходная концентрация 20 мг/мл, конечная концентрация 1,2 мг/мл) и инкубируют 2 часа при 45°C (модифицировано Стюартом (Stuart, 2004))
- iii) Для инактивации протеиназы К гомогенат подвергают денатурации в течение 10 минут при 94°C и центрифугируют 1 минуту при 12 000 g.
- iv) Полученную надосадочную жидкость переносят в новую пробирку, добавляют такой же объем смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1), перемешивают вихревым способом (вортекс), центрифугируют 10 минут при 12 000 g и верхний слой переносят в новую пробирку.

- v) Для осаждения ДНК добавляют 0,1 объема 3-х молярного ацетата натрия (рН 5.2) и два объема абсолютного этанола и смесь инкубируют при -20°C в течение ночи или в течение более короткого периода (например, 20-30 минут) при -80°C . Осаждают ДНК центрифугированием при 12 000 *g* в течение 5–15 минут при 4°C .
- vi) Аккуратно удаляют этанол и промывают осадок 1 мл 70% этанола (объем/объем).
- vii) Высушенная ДНК может быть ресуспендирована в 1 мл буфера TE (10 мМ Tris/Cl, рН 7.5, 1 мМ EDTA) и храниться при 4°C для дальнейшего анализа или при -20°C для длительного хранения.
- viii) Для каждой сессии необходимо добавлять отрицательный контроль (100 мкл фосфатно-солевого буфера) и положительный контроль (100 мкл гомогената, полученного от кролика с положительным результатом на наличие вируса).

1.6.2. ПЦР-Амплификация и обнаружение вируса миксомы на агарозном геле

- i) Экстрагированная ДНК амплифицируется посредством ПЦР с использованием праймеров:
- M071-F: 5'-ACC-CGC-CAA-GAA-CCA-CAG-TAG-T-3' (67,229nt -67,250nt)
- M071-R: 5'-TAA-CGC-GAG-GAA-TAT-CCT-GTA-CCA-3' (67,700nt -67,677nt)
(Cavadini *et al.*, 2010).
- ii) ПЦР-амплификация осуществляется в 25 мкл. Порядок действий и условия изложены в Таблицах 2 и 3.
- iii) Для каждой ПЦР-реакции необходимо добавлять отрицательный контроль (вода, свободная от ДНКаз) и положительный контроль (5-10 нг ранее выделенной и исследованной ДНК кролика с положительным результатом на наличие вируса).

Таблица 2: Компоненты ПЦР

Реагенты	Конечная концентрация	Объемы
ДНК		5–10 нг
Буфер 5×	1×	5 мкл
Праймер-F (20 пмоль/мкл)	0,4 пмоль/мкл	0,5 мкл
Праймер-R (20 пмоль/мкл)	0,4 пмоль/мкл	0,5 мкл
дНТФы (2.5 мМ кажд.)	0,2 мМ	2 мкл
БСА (1 мг/мл)	0,1 мг/мл	2,5 мкл
Тақ 5 ед/мкл	0,04 ед/мкл	0,2 мкл
Свободная от		XX ²

² Объем H₂O зависит от объема ДНК, используемой в реакции

ДНКаз Н ₂ О		
Конечный объем		25 мкл

Таблица 3: ПЦР: температурный профиль

Стадии	Температура	Время	Количество циклов
Денатурация	95°C	5 минут	1
Денатурация	95°C	30 секунд	40
Отжиг	60°C	30 секунд	
Элонгация	72°C	40 секунд	
Элонгация	72°C	7 минут	1
	4°C	∞	1

iv) По окончании амплификации 10 мкл реакционной смеси анализируют с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Положительный результат определяется наличием полосы для фрагментов длиной 471 п.о., соответствующих части M071L гена-мишени в положительном контроле. Если полоса появляется в отрицательном контроле, это показывает наличие перекрестной контаминации в ходе процедуры ПЦР и анализ необходимо повторить.

1.6.3. ПЦР-амплификация и обнаружение вакцинных штаммов Borghi и SG33

ix) Для идентификации вакцинных штаммов при помощи ПЦР используются следующие пары праймеров:

VAX-F: 5'-ACA-AGA-ATA-TAC-TAA-AGA-ATA-CCA-CG-3' (138,997nt–139,021nt)

Borghi-R: 5'-TAG-CGC-GCA-TGG-CGA-CCC-TTG-GT-3' (139,398nt–139,420nt)

специфические для вакцинного штамма Borghi (размер ампликона 405 п.о.) и

VAX-F: 5'-ACA-AGA-ATA-TAC-TAA-AGA-ATA-CCA-CG-3' (138,997nt–139,021nt)

SG33-R: 5'-GAC-GTG-CAT-GGC-GAC-CCT-TTT-TGC-GTG-T-3' (139,398nt–139,419nt)

специфические для вакцинного штамма SG33 (размер ампликона 409 п.о.) (Cavadini *et al.*, 2010).

ПЦР-амплификация и анализ проводятся, как описано выше, с той разницей, что температура отжига составляет 56°C.

2. Серологические исследования

Инфицирование кроликов штаммами вируса миксомы (MYXV) вызывает сильный

адаптивный иммунный ответ, сопровождающийся выработкой специфических антител классов IgM и IgG (Kerr, 1997). Это происходит также при вакцинации живой вакциной и при инфицировании низкопатогенными штаммами МУХV, хотя в этих случаях титры антител ниже, чем для высоковирулентных штаммов. IgM появляются на 5-6 день после заражения и обычно сохраняются в течение 30-40 дней. Пик концентрации IgG наступает на 20–30 день, и они присутствуют в организме кроликов, инфицированных естественным путем, в течение, как минимум, 2 лет. В зависимости от величины титра дозы, антитела класса IgG к вирусу миксомы могут быть обнаружены у молодых кроликов вплоть до двухмесячного возраста. Как следствие, серологический анализ на антитела к МУХV очень полезен для большинства целей, указанных в таблице 1. Однако следует принять во внимание, что защита кроликов от миксоматоза зависит в большей степени от клеточно-опосредованного иммунного ответа, чем от сывороточных антител. Следовательно, титры антител к вирусу миксомы не являются прямым индикатором уровня защиты от заболевания. Наконец, учитывая крайне ограниченную степень генетической изменчивости иммунодоминантных протеинов МУХV (то есть, иммунодоминантного протеина оболочки – IMV – M071L) серологический анализ не может использоваться для типирования различных полевых изолятов МУХV.

Для обнаружения сывороточных антител к вирусу миксомы использовалось множество методов, от традиционной иммунодиффузии в геле агара до современного иммуноферментного анализа (ИФА). На данный момент различные варианты ИФА являются предпочтительным выбором благодаря своей простоте, скорости, низкой стоимости и высокой чувствительности и специфичности. Реакция связывания комплемента (РСК) более не рекомендуется к применению из-за низкой чувствительности метода (Gelfi *et al.*, 1999).

2.1. Непрямой иммуноферментный анализ (Н-ИФА)

Для серологического анализа на наличие вируса миксомы разработаны и используются два схожих варианта непрямого ИФА с антигеном, непосредственно иммобилизованным на твердой фазе. Результаты первого варианта анализа (Н-ИФА-1), описанные Керром (Kerr, 1997), сравнивались с результатами, полученными в ходе реакции нейтрализации, тогда как результаты второго варианта анализа (Н-ИФА-2), разработанного Гелфи и соавторами (Gelfi *et al.*, 1999), сравнивались с результатами реакции непрямо́й иммунофлуоресценции (РНИФ) и реакции связывания комплемента (РСК). Оба варианта ИФА продемонстрировали схожую эффективность, превышающую эффективность других методов серологического исследования.

2.1.1. Н-ИФА-1 (Kerr, 1997)

i) Подготовка антигена

а) Штамм Lausanna (LU), выделенный в Бразилии в 1949 году, *де-факто* считается международным эталоном штамма вируса миксомы (код ATCC VR-115). В качестве альтернативы, учитывая высокую степень антигенной стабильности МУХV, в качестве лабораторного эталона может быть использован региональный высоковирулентный изолят. Вирус должен быть адаптирован к развитию *in vitro* для получения исходных штаммов с высокими титрами после инкубации в течение 48–72 часов.

- b) Исходные штаммы вируса культивируют в клетках линий RK-13 или SIRC, выращенных в минимальной поддерживающей среде (MEM) с добавлением 10% телячьей сыворотки, пенициллина (200 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Титрование вируса можно производить по фокусообразующим единицам, как описано ниже. Исходные штаммы вируса подвергаются аликвотированию и хранятся замороженными при -80°C .
- c) Вирионы выращивают в клетках культур RK-13 или SIRC в культуральных флаконах на 180 см^2 , множественность заражения (MOI) составляет 0,02–0,05 (примерно 1 патогенный вирион на каждые 20–50 клеток культуры). Инфицируют 6–12 флаконов для каждого препарата, оставив вирус развиваться до появления стандартного цитопатического эффекта.
- d) Монослой клеток дважды промывают фосфатно-солевым буфером, pH 7.2, удаляют клетки из флакона и осаждают центрифугированием (800 g, в течение 10 минут при 4°C).
- e) Ресуспенсируют осадок в 5 мл холодного фосфатно-солевого буфера и обрабатывают ультразвуком для высвобождения внутриклеточного вируса. Нагревают суспензию с ДНКазой 1 (25 мкг/мл) и РНКазой А (50 мкг/мл) при 37°C в течение 30 минут при частом перемешивании.
- f) Осаждают вирионы центрифугированием (250 000 g, 20 минут при 4°C) с применением ступенчатого градиента, формируемого путем наслоения 10% декстрана Т10 с аналогичным объемом 36% сахарозы (оба раствора в 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) и 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA).
- g) Ресуспенсируют осадок в холодном фосфатно-солевом буфере в первоначальном объеме и повторяют описанный выше этап осаждения. Затем ресуспенсируют осадок в 0,5–1,0 мл холодного фосфатно-буферного раствора, аликвотируют и хранят замороженным при -20°C в качестве исходного раствора антигена.
- h) Чтобы определить разбавление для использования антигена в ходе ИФА, титруют исходный раствор антигена положительной референтной сывороткой для получения оптической плотности (OD) = 1,0 при разведении сыворотки 1/100. Данный этап осуществляется в соответствии с протоколом исследования методом ИФА, приведенным ниже.
- ii) *Количественный анализ МУХV по фокусообразующим единицам (Smallwood et al., 2010)*
- a) Осуществляют посев на шестилуночный культуральный планшет, используя 1/5 культурального флакона на 75 см^2 (примерно $2-4 \times 10^5$ клеток) с почти сплошным слоем клеток CV-1 (фибробласты почек африканской зеленой мартышки) или, в качестве альтернативы, клеток RK-13.
- b) Смешивают клетки с полной минимальной поддерживающей средой (MEM) до получения конечного объема = 12 мл для посева в каждую из шести лунок. Пипеткой внести по 2 мл в каждую лунку планшета.
- c) Инкубируют при 37°C в атмосфере, содержащей CO_2 . Когда конфлуентность составит

80–90% (обычно через 20–28 часов), переходят к инфицированию.

- d) Перед инфицированием проверяют вирусный препарат на наличие агрегатов. Если присутствие таковых установлено или предполагается, проводят один цикл обработки раствора ультразвуком в течение 10-15 секунд. В ходе ультразвуковой обработки пробирку размещают на льду.
- e) Осуществляют серийное десятикратное разбавление вируса в полной МЕМ, начиная с 10^{-2} и до 10^{-8} . Удаляют среду из планшета и добавляют 0,5 мл каждого разведения в одну лунку.
- f) Инкубируют планшет при 37°C в атмосфере CO_2 для адсорбции вируса на клетках. Если в инкубаторе не установлен шейкер, каждые 10 минут вручную слегка покачивают планшет для перераспределения жидкости.
- g) По прошествии 1 часа добавляют 1,5 мл полной МЕМ в каждую лунку. Инкубируют 2–5 дней при 37°C в атмосфере, содержащей CO_2 .
- h) Отсасыванием удаляют среду из лунок. Добавляют 0,4–0,5 мл раствора кристаллического фиолетового (0,1% [вес/объем] раствор кристаллического фиолетового в 20% этаноле) в каждую лунку, вливая раствор аккуратно по стенке лунки, чтобы не сместить клетки.
- i) Слегка покачивают планшет и инкубируют до 1 часа при комнатной температуре. Отсасыванием удаляют краситель и переворачивают планшеты для высушивания лунок.
- j) Под инвертированным микроскопом производят подсчет фокусов в лунках, которые имеют <100 (это должно быть возможно, как минимум, для двух находящихся рядом лунок).
- к) Производят подсчет титра (ФОЕ [фокусообразующие единицы]/мл): $\text{титр} = \text{количество фокусов} \times \text{разбавление} \times 2$.

iii) Приготовление референтных лабораторных сывороток

Используют взрослых кроликов (2-3-х месячного возраста), не привитых от миксоматоза и полученных из кролиководческой фермы или хозяйства, свободных от миксоматоза.

- a) Стандартные сыворотки для положительного контроля: вакцинируют от миксоматоза 3–5 кроликов. Через 30 дней вводят кроликам вирулентный штамм миксоматоза (предпочтительно вводить тот же штамм, который использовался для приготовления антигена). Если титр вируса известен, вводят 100–200 бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 0,1 мл внутривенно. На 30-й день после контрольного заражения кроликов умерщвляют, производят забор крови и осуществляют приготовление сыворотки в соответствии со стандартным протоколом.
- b) Стандартные сыворотки для отрицательного контроля: умерщвляют 3–5 кроликов, производят забор крови и осуществляют приготовление сыворотки в соответствии со стандартным протоколом.

Хранят аликвотированные сыворотки при -20°C .

iv) Протокол исследования методом ИФА

Используют планшет для ИФА с высокой степенью связывания.

- a) Нанести на планшет раствор антигена (50 мкл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), рН 7,2) с заранее установленным разбавлением (см. выше) и инкубировать 2 часа при 37°C.
- b) Промыть планшет 5% (вес/объем) раствором сухого обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере (молоко/буфер). Производить блокировку планшета раствором молока в ФСБ в течение ночи при 4°C.
- c) Нанести на планшет сыворотки
 - Идентификация отрицательной и положительной сывороток: развести 1/100 референтную и исследуемую сыворотки раствором молока в фосфатно-солевом буфере и добавить 50 мкл в каждую лунку. Оставить две лунки в качестве контроля (то есть, внести пипеткой только 50 мкл раствора молока в ФСБ).
 - Определение титра сыворотки: все сыворотки разбавляют двукратно, начиная с разведения 1/100, непосредственно на планшете для ИФА при помощи многоканальной пипетки. Оставить две лунки в качестве контроля (то есть, внести пипеткой только 50 мкл раствора молока в фосфатно-солевом буфере).
- d) Инкубировать планшет 2 часа при 37°C.
- e) Трижды промыть фосфатно-солевым буфером и 0,05% Tween 20 (фосфатно-солевой буфер/Tween).
- f) Добавить конъюгат антикроличьих антител с пероксидазой хрена, разведенный фосфатно-солевым буфером/молоком согласно рекомендациям поставщика. Инкубировать 30 минут при 37°C.
- g) Шестикратно промыть планшет, используя фосфатно-солевой буфер/tween.
- h) Добавить 100 мкл субстрата (ABTS: 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) в концентрации 1 мг/мл плюс 0,06% пероксид водорода, в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере при рН 4,0).
- i) Инкубировать при комнатной температуре и измерять поглощение при 405 нм, используя ИФА-спектрофотометр для считывания микропланшет.

v) Интерпретация результатов

Перед анализом результатов ИФА вычитают среднее значение оптической плотности (ОП) двух контрольных лунок из величины оптической плотности всех сывороток в планшете. После этого оптическая плотность сыворотки для отрицательного контроля должна составлять меньше, чем 0,1 ОП.

- a) Сыворотка считается отрицательной, если соответствующее значение ОП равно или ниже значения ОП для отрицательной контрольной сыворотки плюс 0,1 ОП.
- b) Сыворотка считается положительной, если соответствующее значение ОП выше значения ОП для отрицательной контрольной сыворотки плюс 0,25 ОП.
- c) Сыворотка, значение ОП для которой выше порогового значения отрицательного

результата, но ниже порогового значения положительного результата считается неопределенной или сомнительной.

В случае титрования положительных сывороток до конечной точки, титр соответствует последнему разведению с положительным значением ОП, то есть, значению ОП, равному ОП отрицательных контрольных сывороток при разведении 1/100 (из которого всегда вычитают фоновое значение) плюс 0,1 ОП.

2.1.2. Н-ИФА-2 (Gelfi et al., 1997)

i) Подготовка антигена

Этот этап схож с аналогичным этапом Н-ИФА-1, с учетом следующих небольших различий:

- a) РК-13 выращивают в минимальной поддерживающей среде (MEM) с добавлением 2% телячьей сыворотки
- b) Инфицированные клетки удаляют из флакона, осаждают центрифугированием на низких скоростях и промывают один раз в 20 mM Tris, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 150 mM NaCl, pH 8,6 (TL20).
- c) Клетки суспендируют в TL20, помещают на лед на 90 минут (или на ночь) и гомогенизируют в гомогенизаторе Даунса.
- d) После очистки гомогената при 1200 g в течение 10 минут при 4°C 7–9 мл супернатанта наслаивают на 2 мл 36% сахарозной подушки в TL20 и ультрацентрифугируют при 200 000 g в течение 2 часов.
- e) Осадок ресуспендируют в буфере TL20, примерно по 0,5 мл в каждой пробирке. Определяют концентрацию белка при помощи калориметрических методов (то есть, методом Бредфорда или методом с бицинхоновой кислотой).

ii) Приготовление референтных лабораторных сывороток

Данный этап идентичен аналогичному этапу Н-ИФА-1

iii) Метод непрямого ИФА (Н-ИФА)

Используют планшет для ИФА с высокой степенью связывания.

- a) Нанести на планшет раствор антигена в фосфатно-солевом буфере (1 мкг/мл, pH 7,6) и инкубировать в течение ночи при 37°C.
- b) Трижды промыть планшет фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и блокировать планшет инкубированием в растворе желатина в фосфатно-солевом буфере (15 мг/мл) в течение 1 часа при 37°C.
- c) Трижды промыть планшет 0,1%-м ФСБ/Tween 20. Сыворотки серийно двукратно разводят в ФСБ/Tween, начиная с разведения 1/50. Ставят отрицательный и положительный контроль. Оставляют две лунки только с ФСБ вместо сыворотки. Инкубируют планшет в течение 1 часа при 37°C.
- d) Трижды промыть планшет ФСБ/Tween. Добавить конъюгат козьих IgG к кроличьим IgG с щелочной фосфатазой, разведенный ФСБ/Tween согласно рекомендациям

поставщика. Инкубировать планшет 1 час при 37°C.

- е) Четыре раза промыть планшет ФСБ/Tween. Добавить динатриевый п-нитрофенилфосфат с концентрацией 1 мг/мл в 10% диэтаноламине. Оставить планшет при комнатной температуре в темноте на 12 минут и затем остановить реакцию добавлением 2н NaOH. Измерять поглощение при 405 нм, используя ИФА-спектрофотометр для считывания микропланшет.

iv) Интерпретация результатов

При интерпретации результатов используют в качестве ориентира значение ОП отрицательной контрольной сыворотки. Это значение должно быть равно среднему значению ОП для лунок, содержащих только ФСБ. Результаты выражаются как отрицательные или положительные при конкретном разведении сыворотки. За титр исследуемого образца сыворотки принимают величину, обратную максимальному разведению, для которого значение ОП выше, чем трехкратная величина поглощения контрольной отрицательной сыворотки. Образцы сыворотки считаются положительными, начиная с 1/100.

2.1.3. Комментарии и рекомендации в отношении применения вариантов обратного ИФА

Хотя выше приведено достаточно подробное описание методов, каждая лаборатория должна осуществить их стандартизацию и валидацию с учетом местных условий, а также принять во внимание эпидемиологическую ситуацию по рассматриваемому заболеванию в регионе. Кроме того, одним из ключевых реагентов с точки зрения специфичности и чувствительности реакции является конъюгат фермента с анти-Ig кролика. Учитывая, что конъюгат фермента с Ig от разных поставщиков или из разных партий может демонстрировать заметные различия в технических характеристиках, в каждом случае необходима новая частичная стандартизация. Также возможно усовершенствовать приготовление антигена (то есть, более высокие титры и степень очистки), используя подробно описанные методы (Smallwood *et al.*, 2010).

Лабораторные процедуры могут содержать также следующие шаги, которые не были включены в вышеприведенные методы:

- i) После сенсibilизации хранить планшеты при -20°C в пластиковом пакете в течение, по меньшей мере, 3 недель.
- ii) Чтобы ограничить, а еще лучше – устранить замораживание и оттаивание антигена, добавить в препарат, содержащий антиген, 50%-й глицерин и затем хранить при -20°C в жидком состоянии.

2.2. Конкурентный ИФА (МУХV-К-ИФА)

В справочной лаборатории МЭБ по миксоматозу серологические исследования обычно выполняются с применением конкурентного ИФА (К-ИФА), основанного на использовании моноклональных антител (1E5), которые специфически распознают иммунодоминантный белок оболочки вируса миксомы (IMV – открытая рамка считывания M071L). Основные

характеристики данного варианта К-ИФА:

- i) Определение всех классов анти-МУХV-иммуноглобулинов, присутствующих в сыворотке,
- ii) Более высокая специфичность, чем у непрямого ИФА,
- iii) Специфичность становится еще выше благодаря использованию моноклональных антител МАb 1E5 к белку IMV.

Справочная лаборатория МЭБ может предоставить основные реагенты для К-ИФА на вирус миксомы кроликов в наборе с приложением подробной инструкции в отношении методов, включая интерпретацию результатов.

2.3. Приготовление стандартных реагентов для AGID и РНИФ

2.3.1. Приготовление препарата, содержащего антиген

Антиген получают из клеточных культур линии RK-13, как описано выше (Раздел В.2.1.1.i). Монослой собирают примерно через 48 часов после инфицирования, когда в клетках четко прослеживается наличие цитопатического эффекта (80%), и центрифугируют (1000 *g*). Надосадочную жидкость сохраняют. Инфицированные клетки подвергают трехкратному замораживанию-оттаиванию для дополнительного высвобождения вируса, и вирусную суспензию очищают при 1000 *g*. Свежесобранную надосадочную жидкость добавляют к исходному супернатанту. Конечный супернатант является препаратом антигена и хранится при -20°C или -70°C (для более длительной консервации). Перед использованием препарат титруют в клеточных культурах.

2.3.2. Приготовление референтных лабораторных сывороток

Данный этап идентичен аналогичному этапу для вариантов непрямого ИФА (Н-ИФА) (Раздел В.2.1)

2.4. Реакция непрямо́й иммунофлуоресценции (РНИФ)

РНИФ (Gilbert *et al.*, 1989) проводится с использованием клеточных культур линии RK-13 в плоскодонных лунках микротитрационных планшетов:

2.4.1. Процедура проведения теста

- i) Суспензии клеток, 4×10^4 клеток, разведенных в среде, помещают во все лунки, и сплошной клеточный слой формируется в течение 24 часов.
- ii) Удаляют среду и добавляют в каждую лунку 10 мкл вирусной суспензии (с множественностью заражения = 0,05).
- iii) Через 2 часа добавляют 100 мкл MEM, содержащей 2% телячьей сыворотку.
- iv) Через 48 часов инкубирования планшеты промывают ФСБ и фиксируют ацетоном, содержащим 50% этанола, в течение 30 минут при -20°C , или параформальдегидом (4% в ФСБ) при комнатной температуре.
- v) Планшеты затем высушивают при 37°C в течение 15 минут, после чего планшеты можно хранить при -30°C или -70°C в течение 3 месяцев.

- vi) Сыворотки тестируют методом РНИФ с использованием антикроличьих IgG, конъюгированных с флуоресцеинизотиоционатом.
- vii) Результаты теста могут быть качественными, с разведением сывороток 1/20, или количественными, с серийным разведением сыворотки.

2.5. Метод иммунодиффузии в агаровом геле

Агар приготавливают, как описано ранее (Раздел В.1.5.1), используя 6 мл на 10-сантиметровую чашку Петри.

2.5.1. Методика проведения теста

- i) Полоски фильтровальной бумаги, покрытые стандартными антигеном и антисывороткой, и диски, покрытые исследуемыми сыворотками, располагают на поверхности агара (диски между полосками).
- ii) Планшеты инкубируют во влажной атмосфере при 37°C и оценивают результат после 24–48 часов.
- iii) Должно появиться три линии преципитации. Если исследуемые сыворотки содержат антитела, специфичные к вирусу миксомы, как минимум, одна из трех линий изгибается в направлении полосы антигена; в противном случае, она остается прямой. Если сыворотки содержат антиген МУХV, по меньшей мере, одна из линий изгибается в направлении полосы стандартной сыворотки. Данный тест может быть проведен также обычным способом с использованием жидких реагентов в лунках, погруженных в агар.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общие сведения

Для вакцинации против миксоматоза разработаны два типа живых вакцин: гетерологичная вакцина на основе вируса фибромы Шоупа (SFV) (Fenner & Woodroffe, 1954; Shope, 1932), и гомологичная вакцина на основе ослабленных штаммов вируса миксомы (МУХV) (Arguello Villares, 1986; Gorski & Mizak, 1985; Saurat *et al.*, 1978; Tozzini & Mani, 1975; Von Der Ahe *et al.*, 1981). Вакцины обоих типов вводятся подкожно или внутрикожно.

Каждый тип вакцины имеет свои преимущества и недостатки. Вакцины на основе SFV считаются менее иммуногенными. Их применение в последние годы значительно снилось, и они, в целом, редко используются в мясном кролиководстве. Вакцины на основе живого ослабленного вируса миксомы более иммуногенны и обеспечивают более продолжительную защиту (примерно 4-6 месяцев). Однако они могут быть иммунодепрессивными, в особенности для молодых кроликов (Fenner & Woodroffe, 1954; McKercher & Saito, 1964).

Разработан и имеется в продаже в Европе (Spibey *et al.*, 2012) рекомбинантный аттенуированный (ослабленный) штамм вируса миксомы, экспрессирующий капсидный белок вируса геморрагической болезни кроликов (RHDV) и обеспечивающий двойную защиту против миксоматоза и RHDV (Bertagnoli *et al.*, 1996). Аналогичным образом, путем генной инженерии был получен аттенуированный полевой штамм МУХV из Испании (штамм 6918), который прошел лабораторные и полевые испытания в качестве вакцины

против миксоматоза и RHDV для диких кроликов (Angulo & Barcena, 2007).

Рекомендации по производству ветеринарных вакцин изложены в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководящие рекомендации, приведенные ниже и в Главе 1.1.8, носят общий характер и могут дополняться национальными и региональными требованиями.

2. Общая информация по производству вакцин и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики исходного посевного материала

Производство и использование исходного посевного вирусного материала (ИПВМ) осуществляется в соответствии с системой посевных материалов. Обязательна регистрация происхождения, истории пассирования и характеристик ИПВМ.

Для производства вакцины используются ослабленные штаммы вируса фибромы Шоупа (SFV) или вируса миксомы (MYXV).

i) Гетерологичная вакцина на основе вируса фибромы Шоупа

В качестве штамма SFV обычно используют первоначально полученный Шоупом штамм OA (1932), штамм Voerlage, вариант IA и различные близкородственные штаммы. Специфические антигенные характеристики штаммов SFV установлены методом AGID с применением моноспецифических сывороток против вируса фибромы и MYXV.

Штаммы SFV поддерживаются пассированием на кроликах, свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF), или на невакцинированных кроликах из поголовья, свободного от миксоматоза (с отрицательными результатами серологического анализа). Выбривают кожу на спинах здоровых взрослых кроликов и в несколько участков вводят 1% суспензию вирулентного материала. Фибромы полностью развиваются в течение 8-10 дней, после чего кроликов умерщвляют, опухоли удаляют в асептических условиях и гомогенизируют с дистиллированной водой. Суспензию хранят при -30°C или -70°C в 50% забуференном глицерине или в виде 5% разведения в белковом растворе (бычий альбумин). Получить SFV можно также, используя линию дермальных клеток кролика.

ii) Живая ослабленная (аттенуированная) гомологичная вакцина против миксоматоза

Используются полевые штаммы вируса миксомы, ослабленные путем серийного пассирования в куриных яйцах с зародышем, клетках почек кролика при понижении температуры, или клетках куриного эмбриона. Штаммы обычно являются результатом неоднократного клонирования. Для коммерческого производства вакцин получены различные аттенуированные штаммы (MSD, SG33, Borghi, BT 84, MAV, Leon 162, Roxlap, Pisa, и др.).

Идентичность вируса подтверждается при помощи реакции нейтрализации, РИФ или IPMA в клетках линии RK-13 или иных подходящих клеточных линий, с использованием моноспецифической антисыворотки (полученной путем вакцинации кроликов специфическим вакцинным штаммом вируса). Идентичность MYXV может быть подтверждена также молекулярными методами (то есть, ПЦР с использованием

праймеров). В последнем случае возможна также более качественная характеристика геномных свойств аттенуированного вирусного штамма.

МҮХV можно также выращивать в культурах клеток куриного эмбриона, полученных от особей, свободных от специфической патогенной флоры. Кроме того, МҮХV можно культивировать в подходящих клеточных линиях (линия дермальных клеток кролика) и в клетках RK-13.

iii) Рекомбинантный аттенуированный живой штамм МҮХV, экспрессирующий RHDV

Вакцина состоит из штамма вируса миксомы, аттенуированного в лабораторных условиях, и гена капсидного белка изолята RHDV (Bertagnoli *et al.*, 1996; Spibey *et al.*, 2012). Используются стандартные лабораторные методы для живой аттенуированной вакцины против вируса миксомы, а капсидный ген RHDV вставляют в локус MGF/M11L генома МҮХV. Подготовку материала для вакцины проводят в клетках почек кролика (RK-13).

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних веществ)

Исходный посевной материал не должен быть загрязнен бактериями, грибами, микоплазмой и вирусами. Чистоту определяют при помощи анализов на присутствие различных загрязнителей, то есть, посторонних вирусов, бактерий, микоплазмы и грибов. Анализы на стерильность и отсутствие биологических загрязнителей выполняются в соответствии с главой 1.1.4.

В частности, анализ на наличие посторонних вирусов осуществляется путем инокуляции сплошного монослоя клеток Vero. Вакцину, приведенную к эквиваленту 20 доз на мл, нейтрализуют таким же объемом моноспецифической гипериммунной сыворотки в течение 30 минут при 37°C. Смесь фильтруют через фильтр с мембраной 0,22 мкм и вносят по 1 мл в пять 25-миллилитровых сосудов с клеточными культурами, за которыми далее наблюдают в течение 7 дней. Затем клетки собирают, суспендируют в среде и подвергают нескольким циклам замораживания-оттаивания, после чего центрифугируют и фильтруют, материал инокулируют в свежие клеточные культуры и наблюдают 7 дней. Не должны присутствовать признаки цитопатического эффекта или, чтобы исключить наличие RHDV, гемагглютинации человеческих эритроцитов 0 группы.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Анализ производится для каждого указанного способа введения. Используют не менее 10 кроликов минимального возраста, рекомендованного для вакцинации, с отрицательным результатом серологического исследования на миксоматоз. Вводят рекомендованным способом количество вируса, соответствующее не менее чем десятикратному максимальному титру, содержащемуся в дозе вакцины. Наблюдают за кроликами в течение 28 дней. Регистрируют температуру тела за день до вакцинации, на момент вакцинации, через 4 часа после вакцинации и далее ежедневно в течение 4 дней; отмечают максимальный подъем температуры для каждого животного. Не должно наблюдаться отклоняющихся от нормы местных или системных реакций; средний подъем температуры не должен превышать 1°C, и ни у одного животного температура не должна повышаться больше чем на 2°C. Допускается местная реакция продолжительностью не более 28 дней.

Должна быть проведена оценка безвредности вирусных штаммов (как SFV, так и

МҮХV), используемых для изготовления вакцины, для беременных самок и для крольчат, питающихся молоком матери (см. Раздел С.2.3.2). Кроме того, они должны быть безвредны для других видов (например, морских свинок, взрослых мышей и зайцев).

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

i) Гетерологичная вакцина на основе вируса фибромы Шоупа

Изначально SFV получали путем множественного внутрикожного введения посевного вируса в кожу спины кроликов. Продукт, содержащий гомогенат вируса фибромы, должен использоваться немедленно или храниться в замороженном состоянии. Сегодня вирус можно выращивать в дермальных клетках кролика, например, клетках линии RK-13 (Jerabek, 1980). После очистки центрифугированием надосадочную жидкость смешивают со стабилизатором, содержащим антибиотики, и помещают в ампулы или флаконы для лиофилизации. В качестве адьюванта может быть добавлен каолин (40 мг/мл) для повышения интенсивности и длительности иммунизации. В этом случае вакцину вводят подкожно.

ii) Живая аттенуированная гомологичная вакцина против миксоматоза и рекомбинантная живая аттенуированная вакцина против МҮХV+RHDV

МҮХV выращивают в клетках подходящей клеточной линии (например, RK-13). Через 2-6 дней вирус собирают. Содержащую вирус суспензию можно хранить при –70°C. Вакцину изготавливают путем разведения в установленных пропорциях вирус-содержащего препарата со стабилизатором для лиофилизации. После гомогенизации продукт помещают в сосуды для лиофилизации, запечатывают в вакууме или в стерильном азоте.

2.2.2. Технологический контроль

Специфическую активность партии определяют путем измерения содержания вируса. Серийные разведения вакцины (на основе SBV или МҮХV) инокулируют в соответствующие клеточные культуры. Одна доза вакцины должна содержать не менее предварительно установленного минимального титра. Если вакцинный штамм не адаптирован к культурам, должен проводиться тест на эффективность на кроликах (см. Раздел С.2.3.3).

i) Гетерологичная вакцина на основе вируса фибромы Шоупа

Титр SFV изначально измерялся *in vivo* путем вычисления ID₅₀ после внутрикожной инокуляции серийных разведений очищенной надосадочной жидкости в несколько участков (например, в пять) максимум шести кроликам. Для подтверждения адекватной реакции кроликов на инокуляцию каждому животному водили также разведение стандартного препарата SFV.

Титрование можно также осуществлять с использованием клеток RK-13 (TCID₅₀).

ii) Живая аттенуированная гомологичная вакцина против миксоматоза и рекомбинантная живая аттенуированная вакцина против МҮХV+RHDV

Титрование вируса миксомы можно осуществлять в клетках RK-13 (TCID₅₀).

В каждом случае титр должен соответствовать необходимой активности, установленной по результатам анализа специфической активности партии (см. Раздел С.2.3.3).

2.2.3. Анализ партии готового продукта

i) Стерильность

См. Раздел С.2.1.2.

ii) Идентичность

Идентичность SFV и MYXV устанавливается одним из методов идентификации возбудителя (например, РИФ или IPMA с использованием моноспецифичной сыворотки или моноклональных антител) в клетках RK-13.

iii) Безвредность

Пробы для анализа вакцины на безвредность отбираются из партии, произведенной в соответствии с технологией производства вакцины. Доза, предназначенная для применения, должна содержать максимальный титр или иметь максимальную активность, установленные производителем (титр выпускаемой партии).

a) Гетерологичная вакцина на основе вируса фибромы Шоупа

Патогенность штаммов SFV исследуется путем инокуляции кроликам серийных разведений надосадочных жидкостей, полученных путем центрифугирования препаратов опухолевого материала. У кроликов, свободных от специфической патогенной микрофлоры, периодически проверяются макроскопические и гистопатологические свойства и ход развития фибром. Следует учитывать, что многочисленные серийные пассажи могут вызвать мутацию вызывающего воспаление штамма IA, приводящую к тяжелым повреждениям, которые носят более воспалительный, чем опухолевый характер.

b) Живая аттенуированная гомологичная вакцина против миксоматоза и рекомбинантная живая аттенуированная вакцина против MYXV+RHDV

Остаточная патогенность штаммов MYXV исследуется путем внутрикожной инокуляции кроликам, свободным от специфической патогенной микрофлоры, или невакцинированным кроликам, свободным от миксоматоза (имеющим отрицательные результаты серологического анализа). У животных допускается не более чем развитие местной реакции с возможными небольшими вторичными повреждениями на голове, исчезающими в течение нескольких дней.

Для всех типов вакцин в качестве дополнительных параметров должны регистрироваться ректальная температура и вес тела. Следует также осуществлять мониторинг изменений в поведении и приеме пищи и питья. Кролики должны находиться под наблюдением в течение 28 дней.

2.3. Требования для получения разрешения, регистрации и лицензирования

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины следует представить в компетентные органы все соответствующие сведения, касающиеся производства вакцины (см. Раздел С.2.2) и методов контроля качества (см. Раздел С.2.1.2). Указанная информация должна включать сведения в отношении трех последовательно произведенных партий объемом не менее 1/3 стандартного промышленного объема. Методы технологического контроля являются частью производственного процесса.

2.3.2. Требования в отношении безвредности

Для демонстрации различных аспектов безвредности вакцины проводят несколько тестов. Должна быть подтверждена безопасность дозы, десятикратно превышающей нормальную дозу. Кроме того, необходимо исследовать распределение вакцинного вируса в органах вакцинированного животного, способность вакцинного вируса передаваться от вакцинированного животного к контактирующим с ним особям, и наличие/отсутствие у вакцинного вируса реверсии вирулентности.

i) Тест на использование дозы, десятикратно превышающей нормальную дозу.

После вторичной гидратации десять доз лиофилизированной вакцины на основе SFV вводят подкожно каждому из трех восприимчивых к вирусу кроликов, за которыми затем наблюдают в течение 21 дня. Местные реакции должны быть слабовыраженными, при отсутствии генерализации и влияния на общее состояние здоровья. Вакцину на основе МУХV тестируют, вводя десятикратную дозу внутрикожно в уши восприимчивых к вирусу кроликов, за которыми затем наблюдают в течение 21 дня. Первичное миксомное поражение должно носить слабовыраженный характер, при отсутствии аномальной местной или системной реакции.

ii) Тест на применение вакцины у беременных кроликов

Вводят вирус не менее чем десяти беременным кроликам в соответствии с рекомендуемой схемой, указанной на этикетке. Продолжают наблюдение до первого дня после родов. Кролики должны оставаться здоровыми, не допускается наличие отклоняющихся от нормы местных или системных реакций. Не должно наблюдаться нежелательного воздействия на беременность или на рожденное потомство.

iii) Тест на потенциальное повышение вирулентности (реверсия вирулентности)

Вводят рекомендованным способом двум 5-7-недельным кроликам, у которых отсутствуют антитела к вирусу миксомы, количество вируса, которое позволит выделить вирус для пассажей, описанных ниже. Используют вакцинный вирус наименее аттенуированного пассажного уровня в диапазоне между исходным посевным материалом и партией вакцины. Через 5-10 дней после инокуляции кроликов умерщвляют и извлекают органы или ткани, содержащие достаточное для пассажа количество вируса. Органы и ткани гомогенизируют в подходящем буферном растворе, полученную суспензию центрифугируют и используют супернатант для дальнейших пассажей. Инокулируют супернатант в подходящие клеточные культуры, чтобы удостовериться в присутствии вируса. Вводят надлежащим способом требуемый объем супернатанта двум другим кроликам аналогичного возраста и восприимчивости. Данную операцию повторяют не менее пяти раз. Если вирус исчезает, проводят вторую серию пассажей. Инокулируют кроликам вирус самого высокого полученного пассажного уровня, наблюдают в течение 28 дней и

сравнивают возникающие реакции с теми, которые наблюдались в изложенном выше тесте на безвредность. Не должно быть признаков роста вирулентности в сравнении с непассированным вирусом. Если вирус не выделен ни в одной из двух серий пассажей, то вакцинный вирус также считается успешно прошедшим данный тест.

2.3.3. Требования к эффективности

Необходимо провести различные исследования с участием репрезентативных партий конечного продукта, содержащих минимальный титр или характеризующихся минимальной специфической активностью. Для вакцин на основе SFV и MYXV применяется один и тот же протокол исследований. Защитное действие вакцины демонстрируется следующим образом:

Не менее десяти взрослым кроликам инокулируют дозу вакцины, еще пять кроликов служат в качестве невакцинированного контроля. Не менее, чем через 21 день после вакцинации всем кроликам соответствующим способом (например, внутривожно в область века или в два участка в боковой области живота) инокулируют патогенный штамм MYXV (пример: 0,1 мл инокулята вирусного штамма Lausanne, содержащего 10^3 ID₅₀ [средняя инфицирующая доза]). Наблюдают за кроликами еще 21 день. Результаты теста недействительны, если менее 90% кроликов в контрольной группе демонстрируют типичные признаки миксоматоза. Вакцина, содержащая MYXV, считается успешно прошедшей испытания, если не менее 90% вакцинированных кроликов не имеют признаков миксоматоза. Вакцина, содержащая SFV, считается успешно прошедшей испытания, если не менее 75% вакцинированных кроликов не имеют признаков миксоматоза.

Производитель должен установить минимальное значение титра или специфической активности с учетом потерь активности при хранении.

2.3.4. Продолжительность иммунитета

Вакцинируют несколько групп, состоящих из 10 восприимчивых к вирусу кроликов. Одну партию вакцины тестируют методом контрольного заражения (как в тесте на эффективность, см. С.2.3.3) на 1, 2, 3, и т.д. месяцы после вакцинации для вакцины на основе SFV и на 1, 3, 6 и 9 месяцы для вакцины, содержащей MYXV. Продолжительность иммунитета устанавливается, исходя из периода времени, в течение которого не менее 90% кроликов, вакцинированных вакциной, содержащей MYXV, или не менее 75% кроликов, вакцинированных вакциной на основе SFV, не проявляют признаков миксоматоза.

2.3.5. Стабильность

Исследование стабильности (на основании подходящего теста на специфическую активность) требуется для установления корректного срока годности, указываемого на упаковке продукта. Некоторые компетентные органы допускают применение ускоренных испытаний для определения примерного срока

годности продукта, например, инкубирование при 37°C в течение 1 недели за каждый год срока хранения. Подобные оценки должны быть подтверждены тестами на специфическую активность, периодически проводимыми в режиме реального времени с использованием не менее трех различных партий/серий в течение периода,

ограниченного датой окончания срока годности, плюс 3-6 месяцев после этой даты. Для аттенуированных живых вакцин тестирование должно осуществляться непосредственно после выпуска и по истечении примерного срока годности, если не имеется статистически достоверных учетных данных.

Титрование вакцинного вируса производится с определенными интервалами вплоть до истечения 3 месяцев после окончания установленного срока хранения, с использованием, как минимум, трех партий вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ALBINI S., SIGRIST B., GÜTTINGER R., SCHELLING C., HOOP R.K. & VÖGTLIN A. (2012). Development and validation of a

Myxoma virus real-time polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24** (1), 135–137.

ANGULO E. & BARCENA J. (2007). Towards a unique and transmissible vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease for rabbit populations. *Wildl. Res.*, **34**, 567–577.

ARGUELLO VILLARES J.L. (1986). Contribución a la profilaxis de la mixomatosis del conejo mediante el uso de una ceba homologa. *Medicina Veterinaria*, **3**, 91–103.

BELSHAM G.J., POLACEK C., BREUM S.Ø., LARSEN L.E. & BØTNER A. (2010). Detection of myxoma viruses encoding a defective M135R gene from clinical cases of myxomatosis; possible implications for the role of the M135R protein as a virulence factor. *Virology*, **7**, 7.

BERTAGNOLI S., GELFI J., LEGALL G., BOILLETOT E., VAUTHEROT J.F., RASSCHAERT D., LAURENT S., PETIT F., BOUCRAUT-

BARALON C. & MILON A. (1996). Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma virus expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.*, **70**, 5061–5066.

BEST S.M., COLLINS S.V. & KERR P.J. (2000). Coevolution of host and virus: cellular localization of virus in myxoma virus infection of resistant and susceptible European rabbits. *Virology*, **277** (1), 76–91.

CAMUS-BOUCLAINVILLE C., GRETILLAT M., PY R., GELFI J., GUERIN J.L. & BERTAGNOLI S. (2011). Genome sequence of

SG33 strain and recombination between wild-type and vaccine myxoma viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, **17** (4), 633–638.

CANCELLOTTI F.M., GELMETTI D. & TURILLI C. (1986). Diagnostic techniques for early diagnosis of rabbit Myxomatosis. *IV International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. Amsterdam, Netherlands. Utrecht: Koninklijke Nederlandse Maatschappij voor Diergeneeskunde, pp 798–801.

CAVADINI P., BOTTI G., BARBIERI I., LAVAZZA A. & CAPUCCI L. (2010). Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. *Vaccine*, **28** (33), 5414–5420.

DUARTE M.D., BARROS S.C., HENRIQUES A.M., FAGULHA M.T., RAMOS F.,

LUÍS T. & FEVEREIRO M. (2013).

Development and validation of a real-time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. *J. Virol. Methods*, **196C**, 219–224.

FENNER F. (1994). Myxoma virus. *In: Virus Infections of Vertebrates, Vol. 5. Virus Infections of Rodents and Lagomorphs*, Osterhaus A.D.M.E., ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands, pp. 59–71.

FENNER F & FANTINI B. (1999). *Biological Control of Vertebrate Pests. The History of Myxomatosis – an Experiment in Evolution*. CAB International, New York, USA.

FENNER F. & RATCLIFFE F.N. (1965). *Myxomatosis*. Cambridge University Press, London, UK.

FENNER F. & WOODROOFE G.M. (1954). Protection of laboratory rabbits against myxomatosis by vaccination with fibroma virus. *Aust. J. Exp. Biol.*, **32**, 653–668.

GELFI J., CHANTAL J., PHONG T.T., PY R. & BOUCRAUT-BARALON C. (1999). Development of an ELISA for detection of myxoma virus-specific rabbit antibodies; test evaluation for diagnostic applications on vaccinated and wild rabbit sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 240–245.

GILBERT Y., PICAUVET D.P. & CHANTAL J. (1989). Diagnostic de la myxomatose: mise au point d'une technique d'immunofluorescence indirecte. Utilisation de prélèvements sanguins sur papier buvard pour la recherche d'anticorps. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **8**, 209–220.

GORSKI J. & MIZAK B. (1985). Polish vaccine against myxomatosis in rabbits. *Med. Weter.*, **41**, 113–116.

JERABEK J. (1980). Applicability of Shope fibroma virus replicated in cell cultures for immunoprophylaxis of rabbit myxomatosis. *Acta Vet. Brno*, **49**, 259–267.

JOUBERT L. (1973). *La Myxomatose T.II. Série : Les Maladies Animales à Virus*. L'Expansion éditeur, Paris, France.

KERR P.J. (1997). An ELISA for epidemiological studies of myxomatosis: persistence of antibodies to *Myxoma* virus in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Wildl. Res.*, **24**, 53–65.

MARCATO P.S. & ROSMINI R. (1986). *Patologia del coniglio e della lepre, atlante a colori e compendio*. Societ Editrice Esculapio, Bologna, Italy, pp. 16–22.

MARLIER D., MAINIL J., LINDEN A. & VINDEVOGEL H. (2000). Infectious agents associated with rabbit pneumonia: isolation of amyxomatous myxoma virus strains. *Vet. J.*, **159**, 171–178.

MCKERCHER D.G. & SAITO J.K. (1964). An attenuated live virus vaccine for myxomatosis. *Nature*, **202**, 933–934. SAURAT P., GILBERT Y. & GANIERE J.P. (1978). Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev. Med. Vet.*, **129**, 415–451.

SHOPE R.E. (1932). A filtrable virus causing a tumor like condition in rabbits and its relationship to virus myxomatosis. *J. Exp. Med.*, **56**, 803.

SMALLWOOD S.E., RAHMAN M.M., SMITH D.W. & MCFADDEN G. (2010). Myxoma virus: propagation, purification, quantification, and storage. *Curr. Protoc. Microbiol.*, May; Chapter 14: Unit 14A.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc14a01s17.

SPIBEY N., MCCABE V.J., GREENWOOD N.M., JACK S.C., SUTTON D. & VAN DER WAART L. (2012). Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vet. Rec.*, **170** (12), 309–313.

SOBEY W.R., CONOLLY D. & ADAMS K.M. (1966). Myxomatosis: a simple method of sampling blood and testing for circulating soluble antigens or antibodies to them. *Aust. J. Sci.*, **28** (9), 354.

STUART N.I. (2004). *Methods in Molecular Biology: Vaccinia Virus and Poxvirology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp. 122–125.

TOZZINI F. & MANI P. (1975). Studio su alcune caratteristiche di crescita del virus della mixomatosi ceppo Pisa 73.

Arch. Vet. Ital., **26**, 19–26.

VON DER AHE C., DEDEK J. & LOEPELMANN H. (1981). Ergebnisse und Erfahrungen in der DDR bei der staatlichen Prüfung und Praxiserprobung der aus der CSSR empортиerten Myxomatose-Vakzine. *Monatshe. Veterinarmed.*, **36**, 492–495.

*

* *

Примечание: Действует референтная лаборатория МЭБ по миксоматозу (см. Таблицу в части 4 настоящего *Руководства по заболеваниям наземных животных* или веб-сайт МЭБ, где размещена обновленная версия списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации в отношении методов диагностики, реагентов и вакцин против миксоматоза обращайтесь в справочную лабораторию МЭБ.