

ГЛАВА 3.7.11

ЧУМА МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ

(ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ)

РЕЗЮМЕ

Чума мелких жвачных (ЧМЖ) – это острое контагиозное заболевание, вызываемое Morbillivirus семейства Paramyxoviridae. Оно поражает в основном овец и коз, и иногда диких мелких жвачных. Основываясь на том факте, что ЧМЖ несколько раз регистрировалась у верблюдов, КРС и буйволов, эти виды животных считаются восприимчивыми, хотя их потенциальная роль в циркуляции вируса ЧМЖ не была официально установлена. ЧМЖ распространена в Африке, за исключением Южной Африки, на Арабском полуострове, в большинстве стран Ближнего Востока и Среднего Востока, а также в Центральной и Юго-Восточной Азии.

Клинические проявления болезни напоминают чуму КРС. Обычно она протекает в острой форме и характеризуется повышением температуры тела, серозными выделениями из глаз и носа, диареей и пневмонией, эрозиями различных слизистых оболочек, в частности ротовой полости. При аутопсии эрозии обнаруживаются в желудочно-кишечном тракте и мочеполовых путях. Легкие могут быть поражены интерстициальной бронхопневмонией и часто вторичной бактериальной пневмонией. ЧМЖ также может протекать в субклинической форме.

ЧМЖ необходимо подтверждать лабораторными методами, так как чума КРС, блютанг, ящур и другие эрозийные или везикулярные заболевания, такие как и контагиозная плевропневмония коз, могут вызывать болезнь, имеющую сходную клиническую картину.

Идентификация возбудителя: *Отбор образцов в правильное время необходим для постановки диагноза посредством выделения вируса; образцы следует отбирать в острой фазе заболевания, когда клинические признаки наиболее очевидны. Рекомендуемые образцы от живых животных включают: мазки конъюнктивальных выделений, секрет из носа, мазки слизистой внутренней стороны щеки и ануса и кровь, обработанную антикоагулянтом.*

Экспресс-диагностика проводится с помощью иммуноферментного анализа с захватом антигена (ИФА), противоточного иммуноэлектрофореза и иммунодиффузии в агаровом геле. Можно также использовать полимеразную цепную реакцию.

Серологические исследования: Серологические исследования, которые используются на рутинной основе, включают нейтрализацию вируса и конкурентный ИФА.

Требования к вакцинам: Эффективные живые аттенуированные вирусные вакцины против ЧМЖ на данный момент широко доступны. Поскольку чума КРС было искоренена во всем мире, не следует использовать гетерологичные вакцины для защиты от ЧМЖ.

А. ВВЕДЕНИЕ

Чума мелких жвачных (ЧМЖ) – острое вирусное заболевание мелких жвачных, характеризующееся повышением температуры тела, выделениями из носа и глаз, стоматитом, диареей и пневмонией со зловонным дыханием. Респираторные признаки ЧМЖ можно спутать с контагиозной плевропневмонией коз или пастереллезом. Во многих случаях пастереллез является вторичной инфекцией ЧМЖ, как следствие иммуносупрессии, индуцируемой вирусом ЧМЖ. Вирус ЧМЖ передается в основном аэрозольно между животными, живущими в близком контакте (Lefevre & Diallo, 1990 г.). Инфицированные животные демонстрируют клинические признаки, схожие с исторически подтвержденными признаками чумы КРС, несмотря на то, что эти два заболевания вызываются разными вирусами.

Исходя из схожести с вирусами чумы КРС, чумы плотоядных и кори, вирус ЧМЖ был классифицирован, как относящийся к роду *Morbillivirus* семейства *Paramyxoviridae* (Gibbs et al., 1979). Члены этой группы вирусов имеют шесть структурных белков: нуклеокапсидный белок (N), который инкапсулирует геномную РНК вируса, фосфопротеин (Р), который ассоциируется с белком полимеразы (L для большого белка), матричный белок (М), белок слияния (F) и белок гемагглютинаина (H). Матричный белок, непосредственно ассоциированный с внутренней поверхностью вирусной оболочки, соединяет нуклеокапсид и внешние вирусные гликопротеины H и F, которые отвечают за прикрепление и проникновение вируса в инфицируемую клетку, соответственно. Геном ЧМЖ также кодирует два неструктурных белка, С и V.

ЧМЖ была впервые описана в Кот-д-Ивуаре (Gargadennec & Lalanne, 1942), но она наблюдается в большинстве африканских стран от севера Африки до Танзании, почти во всех странах Среднего Востока до Турции, а также широко распространена в странах от Центральной Азии до Южной и Юго-Восточной Азии (отредактировано Banyard et al., 2010).

Болезнь поражает в основном коз и овец. В целом, считается, что КРС заражается естественным образом только субклинически, хотя в 1950-ых у телят, экспериментально инфицированных тканью, зараженной вирусом ЧМЖ, регистрировали болезнь и гибель, а вирус ЧМЖ был выделен во время вспышки болезни, схожей с чумой КРС, у буйволов в Индии в 1995 г. Антитела к вирусу ЧМЖ, а также антиген и нуклеиновая кислота вируса ЧМЖ, были выделены в некоторых пробах, полученных от больных верблюдовых в Эфиопии и Судане. Случаи клинической болезни, приведшие к смерти диких мелких жвачных, регистрировались в дикой природе. Американский белохвостый олень (*Odocoileus virginianus*) может быть заражен экспериментально вирусом ЧМЖ. Могут

возникнуть параллельные инфекции другими вирусами, такими как пестивирус и вирус оспы коз.

Инкубационный период длится обычно 4 – 6 дней, но может варьировать от 3 до 10 дней. Клиническое проявление болезни – острое, с повышением температуры до 41 °С, которое может продолжаться в течение 3 – 5 дней; животные находятся в угнетенном состоянии, отказываются от корма и их носовое зеркало становится сухим. Серозные выделения из глаз и носа постепенно становятся слизисто-гнойными и, если гибель не наступает, продолжается в течение приблизительно 14 дней. В течение 4 дней после начала лихорадки развивается гиперемия десен, и в ротовой полости возникают эрозийные поражения с повышенным слюнотечением. Эти поражения могут стать некротическими. Водянистая диарея с кровью часто наблюдается на поздней стадии. Также возможны пневмония, кашель, плевральные хрипы и брюшное дыхание. Уровень заболеваемости может достигать 100% с очень высокой смертностью в тяжелых случаях. Однако уровни заболеваемости и смертности могут быть гораздо ниже при менее тяжелых вспышках, и по этой причине болезнь можно не заметить. Предположительный диагноз ЧМЖ можно поставить на основании клинических признаков, но этот диагноз считается предварительным до тех пор, пока не будет проведено лабораторное подтверждение и дифференциация от других болезней со схожими признаками.

При аутопсии поражения очень схожи с поражениями, наблюдаемыми у КРС, пораженного чумой КРС, за исключением хорошо заметных твердых струпьев на внешних губах и тяжелой интерстициальной пневмонии, часто наблюдающихся при ЧМЖ. Эрозийные поражения могут простираться от ротовой полости до места соединения сетки с рубцом. Характерные красные полосы гиперемий или кровоизлияний могут возникать вдоль продольных складок слизистой толстого кишечника и прямой кишки (полоски зебры), но эти полосы не являются устойчивым выявляемым признаком. Обычно наблюдается эрозийный или геморрагический энтерит с поражением подвздошно-цекального соединения. Пейеровы бляшки могут быть некротическими. Лимфоузлы увеличены, на селезенке и печени могут присутствовать некротические поражения.

Известные риски для здоровья людей, работающих с вирусом ЧМЖ, отсутствуют, так как не было зарегистрировано ни одного случая инфицирования человека этим вирусом. Лабораторные работы должны проводиться при соответствующих уровнях биобезопасности в соответствии с результатами анализом биологических рисков (см. Главу 1.1.4 *Биозащита и биобезопасность: стандарты для управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и вивариях*).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Список, включающий все типы исследований на чуму мелких жвачных, приводится в Таблице 1. Анализы, применимые к отдельным особям или популяциям, могут иметь различные цели, например подтверждение диагноза клинических случаев, определение статуса инфекции для торговли и/или перемещения, оценки превалентности инфекции или подвергания воздействию (надзор) или проверка иммунного статуса после вакцинации (мониторинг).

Таблица 1. Имеющиеся методы исследования для диагностики чумы мелких жвачных и их цель

Метод	Цель				
	Свобода популяции по инфекции	Свобода отдельного животного от инфекции	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹					
ОТ-ПЦР	-	-	+++	-	-
ОТ-ПЦР в реальном времени (QRT-PCR)	-	-	+++	-	-
Вирус выделение в культуре клеток	-	-	++	-	-
Конкурентный ИФА	++	++	-	+++	+++
Обнаружение иммунного ответа					
Реакция вирус нейтрализации	+++	+++	-	+++	+++
ИФА с захватом	-	-	+++	-	-
Иммунодиффузия в агаровом геле	-	-	+	-	-
Противоточный иммуноэлектрофорез	-	-	+	-	+

Пояснение: +++ = рекомендуемый метод; ++ = приемлемый метод; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но затраты, достоверность или другие факторы значительно ограничивают возможности его применения; - = не подходит для этих целей.

Несмотря на то, что не все исследования, помеченные как +++ или ++, прошли официальную валидацию, их рутинный характер и тот факт, что они широко используются без получения сомнительных результатов, делает их приемлемыми.

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ИФА = иммуноферментный анализ.

1. Отбор проб

Пробы для исследований методом вирусвыделения должны перевозиться в лабораторию в охлажденном виде. От живых животных берут мазки конъюнктивальных выделений, а также слизистой носа и внутренней стороны щеки. Во время самой ранней стадии заболевания также отбирают цельную кровь в антикоагулянт для проведения вирусвыделения, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гематологии (в качестве антикоагулянта можно использовать как этилен-диамин тетрауксусную кислоту, так и гепарин, хотя первое вещество предпочтительней для проб, которые будут исследоваться в ПЦР). При аутопсии пробы следует отбирать в асептических условиях от двух или трех животных, в частности из мезентериальных и бронхиальных лимфатических узлов, легких, селезенки и слизистой кишечника, охлаждать на льду и транспортировать при низких температурах. Пробы органов, отобранные для гистопатологии, помещают в 10%

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

нейтральный забуференный формалин. Хорошей практикой является отбор крови для серологической диагностики на всех этапах, но особенно на поздней стадии вспышки.

2. Идентификация возбудителя

а) Иммунодиффузия в агаровом геле

Иммунодиффузия в агаровом геле – очень простой и недорогой тест, который можно проводить в любой лаборатории и даже в полевых условиях. Стандартный вирусный антиген ЧМЖ подготавливают из инфицированного материала мезентериальных или бронхиальных лимфатических узлов, селезенки и легких и измельчают в виде 1/3 суспензии (в/о) в забуференном физиологическом растворе (Durojaiye *et al.*, 1983). Суспензии центрифугируют при 500 g в течение 10 – 20 минут, надосадочную жидкость хранят в аликвотах при -20°C. Вату с ватной палочки, использовавшейся для отбора мазков глаз и носа, снимают с помощью скальпеля и помещают в 1 мл шприц. С помощью 0,2 мл забуференного фосфатного раствора (ЗФР) пробу экстрагируют путем многократного опустошения и наполнения шприца 0,2 мл ЗФР с помощью поршня шприца в пробирку эппендорф. Получившаяся проба мазка глаза/носа, как и указанный выше приготовленный измельченный материал, может храниться при -20°C, пока не понадобится. Они могут храниться в течение 1 – 3 лет. Отрицательный контрольный антиген подготавливается, как и обычные ткани. Стандартную антисыворотку получают посредством гипериммунизацией овец 1мл вируса ЧМЖ с титром 10^4 ТЦД₅₀ (50% инфицирующая доза культуры ткани) на мл с недельным интервалом в течение 4 недель. Кровь отбирают через 5 – 7 дней после последней инъекции (Durojaiye *et al.*, 1983).

- i. Распределить 1% агар в нормальном физиологическом растворе, содержащем тиомерсал (0,4 г/л) или азид натрия (1,25 г/л) в качестве бактериостатического вещества, в чашках Петри (6 мл/5 см).
- ii. В агаре делают шесть лунок в виде шестиугольника с центральной лункой. Лунки должны быть 5 мм диаметром и находиться на расстоянии 5 мм друг от друга.
- iii. Центральную лунку наполняют положительной антисывороткой, три периферийные лунки положительным антигеном, а одну лунку отрицательным антигеном. Две оставшиеся периферийные лунки наполняют тест-антигеном таким образом, чтобы тест-антиген и отрицательный контрольный антиген перемежались с положительными контрольными антигенами.
- iv. Обычно 1-3 линии преципитации будут образовываться между сывороткой и антигенами в течение 18-24 часов при комнатной температуре (Durojaiye *et al.*, 1983). Они усилены посредством промывания агара 5% ледяной уксусной кислотой в течение 5 минут (данная процедура должна проводиться в отношении всех явно отрицательных тестов перед записью отрицательного результата). Положительные реакции демонстрируют линии идентичности с положительным контрольным антигеном.

Результаты получают за один день, но тест не достаточно чувствителен для обнаружения слабых форм ЧМЖ из-за выделения небольшого количества вирусного антигена.

2.2. Встречный электрофорез

Встречный электрофорез (СЕР) является наиболее быстрым тестом для обнаружения вирусного антигена (Majiyagbe *et al.*, 1984). Он проводится на горизонтальной поверхности с использованием специальной камеры для электрофореза, которая состоит из двух отделений, соединенных посредством мостика. Аппарат подсоединен к источнику высокого напряжения. Агар или агарозу (1% - 2%) [масса/объем], растворенные в 0,025 М веронал-ацетатном буфере, выливают на стекло микроскопа в объеме 3 мл. В отвердевшем агаре выбивают от шести до девяти пар лунок. В данном тесте применяются те же реагенты, что и в иммунодиффузии в агаровом геле. Камеру для электрофореза наполняют 0,1 М веронал-ацетатным буфером. Лунки заполняют реагентом: сыворотку помещают в анодные лунки, а антиген в катодные лунки. Пластины помещают на соединительный мостик, а концы соединяют с буферной системой при помощи намоченной пористой бумаги.

2.3. Иммуноферментный анализ с захватом антигена

Консультацию по применению и условиям применения иммуноферментного анализа с захватом антигена (icELISA) можно получить в референтной лаборатории МЭБ по ЧМЖ. Описанный метод доступен как коммерческий набор.

Иммуноферментный анализ с захватом антигена (Libeau *et al.*, 1994) с использованием моноклональных антител (MAb), выработанных против N белка, позволяет осуществить быструю идентификацию ЧМЖ. Необходимо следовать инструкциям поставщика набора, но ниже представлена типичная процедура тестирования.

- i) Титрационные микропланшеты для ИФА сенсibiliзируют 100 мкл раствора для захвата MAb (разведение в соответствии с инструкцией поставщика набора). Сенсibiliзация может проводиться в течение ночи при температуре 4°C или в течении 1 часа при температуре 37°C.
- ii) После промывания 50 мкл суспензии пробы добавляют в каждую из двух лунок, а две контрольные лунки заполняют буфером.
- iii) Немедленно добавляют 25 мкл детекторного биотинилированного MAb к ЧМЖ и 25 мкл стрептавидин/пероксидазу в две лунки.
- iv) Планшеты инкубируют при 37°C в течение 1 часа при постоянном взбалтывании.
- v) После трехкратного усиленного промывания, добавляют 100мкл орто-фенилендиамина (OPD) в 0,03% (объем/объем) перекись водорода и планшеты инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре.
- vi) Реакцию останавливают посредством добавления 100 мкл 1N серной кислоты и поглощаемость измеряется при 492 nm на спектрометре/ИФА ридере.

Точка деления, выше которой пробы считаются положительными, считается на холостой пробе как трехкратные средние значения поглощаемости контрольных лунок.

Тест является очень специфичным и чувствительным (он может обнаружить 10^{06} TCID₅₀/лунка с вирусом ЧМЖ). Результаты получают в течение 2 часов.

Сэндвич ИФА с захватом антигена широко используется в Индии (Singh *et al.*, 2004): сначала пробе дают вступить в реакцию с детекторным МАб и затем иммунный комплекс захватывается МАб или поликлональным антителом, которые абсорбируются на планшете ИФА. Анализ показывает высокую корреляцию с анализом на определение инфекционности клетки (ТЦД₅₀) с минимальным пределом обнаружения 10³ ТЦД₅₀/мл.

2.4. Методы определения нуклеиновой кислоты

Методы ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), основанные на амплификации частей N и F генов белка, были разработаны для специфической диагностики ЧМЖ (Couacy-Numann *et al.*, 2002; Forsyth & Barret, 1995). Данный метод в 1000 раз более чувствителен, чем классическая титрация вируса на клетках Vero (Couacy-Numann *et al.*, 2002). Его преимущество состоит в том, что результаты получают через 5 часов, включая выделение РНК, вместо 10-12 дней для изоляции вируса. Ниже подробно продемонстрированы два наиболее часто используемых протокола. Была представлена мультиплексная ОТ-ПЦР, основанная на амплификации фрагментов N и M генов белка (George *et al.*, 2006). Так же был описан другой формат ОТ-ПЦР, основанный на N гене (Saravanan *et al.*, 2004). Вместо анализа амплифицированного продукта – ампликона - с использованием электрофореза в агарозном геле – его обнаруживают на планшете посредством ИФА с использованием меченых зондов. Данный метод ОТ-ПЦР-ИФА в 10 раз более чувствительный, чем классическая ОТ-ПЦР. В последние годы методы амплификации нуклеиновых кислот для диагностики ЧМЖ были в значительной степени усовершенствованы за счет количественной ОТ-ПЦР в реальном времени (Например, Bao *et al.*, 2008; Vaaten *et al.*, 2011; Kwiatek *et al.*, 2010). Данный метод также в 10 раз более чувствителен чем традиционная ОТ-ПЦР, а также при его использовании снижается риск контаминации. Также было описано применение изотермической амплификации нуклеиновой кислоты в отношении диагностики ЧМЖ (Li *et al.*, 2010). Похоже, что чувствительность данного анализа сходна с ОТ-ПЦР в реальном времени. Данный метод прост в применении, занимает мало времени и результат можно прочесть невооруженным глазом.

По причине того, что это быстро развивающаяся область, пользователям рекомендуют связаться с Референтными лабораториями МЭБ и ФАО² по ЧМЖ (Смотрите таблицу в Части 4 Кодекса по наземным животным) для получения рекомендации относительно наиболее подходящих методов.

2.4.1. ОТ-ПЦР для диагностики вируса ЧМЖ на основании амплификации части N гена

Амплификация N гена основана на первоначальном протоколе, описанном Couacy-Numann *et al.* (2002), в одноэтапном методе ОТ-ПЦР, доступном как коммерческий набор. Для проведения описанного теста необходимы следующие материалы: Набор одноэтапной ОТ-ПЦР Qiagen, дистиллированная вода и праймеры.

- i) Последовательность используемого праймера:

² Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН

Праймер Последовательность
 NP3: 5'-GTC-TCG-GAA-ATC-GCC-TCA-CAG-ACT-3';
 NP4: 5'-CCT-CCT-CCT-GGT-CCT-CCA-GAA-TCT-3').

ii) Приготовьте разведение праймера добавив 5 мкл исходного раствора праймера (100 мкМ) к 45 мкл дистиллированной воды. Концентрацию праймера 10мкМ получают с использованием окончательного объема 50 мкл.

iii) Добавьте 5 мкл матрицы РНК к 45 мкл мастер-микса ПЦР, содержащего:

Реактив	Микс (1 реакция)	Окончательная концентрация
Дистиллированная вода	15 мкл	
5× RT-PCR Buffer	10 мкл	1×
dNTP Mix Qiagen	2 мкл	
Q раствор	10 мкл	
Праймер NP3 (10 мкМ)	3 мкл	0.6 мкМ
Primer NP4 (10 мкМ)	3 мкл	0.6 мкМ
Qiagen Enzyme mix	2 мкл	
Окончательный объем	50 мкл	

iv) Дистиллированная вода (5 мкл) используется вместо РНК для обеспечения отрицательного контроля, который должен быть включен в любой набор ПЦР тестов.

v) Устанавливаются следующие условия термоциклера:

50°C на 30 минут	1 цикл	этап обратной транскрипции
95°C на 15 минут	1 цикл	инактивирует ОТ и активирует полимеразу
94°C на 30 секунд		
60°C на 30 секунд	40 циклов	ПЦР амплификация кДНК
72°C на 1 минуту		
72°C на 5 минут	1 цикл	Конечный фрагмент
4°C (неопределенное) – –		

vi) В результате ОТ-ПЦР получают продукт амплификации равный 351 по. 10 мкл этого продукта анализируют при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Для получения положительных результатов, 40 мкл конечного продукта могут быть использованы непосредственно для секвенирования.

2.4.2. ОТ-ПЦР для диагностики вируса ЧМЖ на основании амплификации части F гена

Данный анализ основан на анализе, первоначально опубликованном в Forsyth & Barrett (1995).

i) Последовательности праймеров, использованные в протоколе:

Праймер	Последовательности
F1b	5'-AGT-ACA-AAA-GAT-TGC-TGA-TCA-CAG-T-3'
F2d	5'-GGG-TCT-CGA-AGG-CTA-GGC-CCG-AAT-A-3'
F1	5'-ATC-ACA-GTG-TTA-AAG-CCT-GTA-GAG-G-3'
F2	5'-GAG-ACT-GAG-TTT-GTG-ACC-TAC-AAG-C-3'

ii) На первом этапе данного анализа используется набор Superscript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HiFi kit (Life Technologies), и амплификация достигается посредством использования праймеров вируса ЧМЖ F1b и F2d, сконструированных против гена F вируса ЧМЖ. Для каждой реакции требуется следующее:

2× реакционная смесь 12.5 мкл

Смесь ферментов 0.5 мкл

Дистиллированная вода без РНК-азы 5 мкл

Праймер F1b (10мкМ) 1 мкл

Праймер F2d (10мкМ) 1 мкл

Общий объем 20 мкл

Примечание 1: все реактивы кроме праймеров и дистиллированной воды без РНКазы поставляются в наборе набор Superscript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HiFi kit.

Примечание 2: Можно приготовить мастермикс для требуемого количества реакций.

iii) Соедините 20 мкл реакционной смеси с 5 мкл РНК в 0,5 мл пробирки для ПЦР. Проведение каждого анализа требует, как минимум, наличия пробы, отрицательного контроля, положительного контроля и безматричного контроля (вода без РНКазы вместо образца РНК).

iv) Перенесите реакции в термоциклер и начинайте процесс по следующей программе:

50°C на 30 минут 1 цикл этап обратной транскрипции

94°C на 2 минуты 1 цикли неактивирует ОТ и активирует полимеразу

94°C на 1 минуту

55°C на 30 секунд 35 циклов ПЦР амплификация кДНК

72°C на 1 минуту

72°C на 7 минут 1 цикл Конечный фрагмент

4°C (неопределенное) – –

- v) Проведите анализ 10 мкл продукта реакции при помощи электрофореза в агарозном геле с использованием 2% агарозного геля в трис-боратном электродном буфере или трис-ацетатном буфере. При наличии РНК вируса ЧМЖ будет амплифицирована до получения фрагмента ДНК равного 447 по. Если продукт ДНК отсутствует или он очень слабый, то можно провести второй цикл ПЦР для увеличения количества продукта ПЦР. Это осуществляется посредством использования Taq PCR Master Mix (Life Technologies) и праймеров F1 и F2. Для проведения каждой реакции требуется следующее:

Taq Mastermix	12.5 мкл
Дистиллированная вода без нуклеазы	9.5 мкл
Праймер F1 (10мкМ)	1 мкл
Праймер F2 (10мкМ)	1 мкл
Общий объем	24 мкл

Примечание: Можно приготовить мастер-микс для требуемого количества реакций.

- vi) Соедините 24 мкл реакционной смеси с 1 мкл продукта 1го этапа ПЦР в 0,5 мл пробирке для ПЦР. Проведение каждого анализа требует, как минимум, наличия пробы, отрицательного контроля, положительного контроля и безматричного контроля (вода без РНКазы вместо продукта ПЦР). Перенесите реакции в термоциклер и начинайте процесс по следующей программе:

94°C на 3 минуты 1 цикл активирует полимеразу

94°C на 1 минуту

55°C на 1 минуту 35 циклов ПЦР амплификация кДНК

72°C на 1 минуту

72°C на 10 минут 1 цикл Конечный фрагмент

4°C (неопределенное) – –

- vii) Проведите анализ 10 мкл продукта реакции при помощи электрофореза в агарозном геле с использованием 2% агарозного геля в трис-боратном электродном буфере или

трис-ацетатном буфере. При наличии РНК вируса ЧМЖ будет амплифицирована до получения фрагмента ДНК равного 371 по.

viii) Продукт ДНК оставшийся от положительных образцов, идентифицированных в (е) или (g) может быть очищен и подвергнут ДНК секвенированию.

2.5. Методы культивирования и выделения

Даже в тех случаях, когда диагностика проводится экспресс методами, для проведения дальнейших исследований следует всегда производить выделение вируса из полевых образцов в тканевых культурах.

Выделение вируса ЧМЖ можно производить в первичных клетках почки/легкого ягненка и некоторых клеточных линиях (Vero, B95a). К сожалению, выделение вируса ЧМЖ с использованием таких клеток не всегда бывает успешным в первом пассаже, и, возможно, потребуются проводить множественные слепые пассажи. Недавно были созданы дериваты клеточных (Vero, CV1), экспрессирующие рецептор морбилливируса, сигнальную молекулу активации лимфоцитов (SLAM или CD150), которые позволяют проводить выделение полевых вирусов из патологических образцов в течение менее одной недели, без необходимости проводить слепые пассажи. Они включает дериват клеточной линии CV1 обезьяны, экспрессирующий козью SLAM (Adombi *et al.*, 2011) и дериваты клеток Vero, экспрессирующие собачью SLAM. Монослойные культуры инокулируют подозрительным материалом (материал мазка, лейкоцитарная пленка или 10% тканевые суспензии) и ежедневно исследуют на наличие цитопатогенного действия (ЦПД). ЦПД, продуцируемое вирусом ЧМЖ, может развиваться в течение 5 дней и включает округление и агрегацию клеток, завершающиеся образованием синцитий в клетках печени ягненка и клеточных линиях, экспрессирующих SLAM. В немодифицированных клетках Vero, иногда трудно увидеть синцитии. Если они существуют, то они очень малы. Однако небольшие синцитии всегда видны в инфицированных клетках Vero, окрашенных гематоксилином и эозином. Синцитии распознают по кольцевому расположению ядер, напоминающему по виду циферблат часов. В культурах на покровных стеклах ЦПД может проявиться ранее дня 5. Некоторые клетки могут содержать внутрицитоплазматические и внутриядерные включения, другие могут быть вакуолизированными. Сходные изменения в клетках могут наблюдаться в окрашенных гистопатологических срезах инфицированных тканей. Через 5–6 дней, следует всегда проводить слепые пассажи, поскольку для проявления ЦПД может понадобиться определенное время.

3. Серологические тесты

Демонстрация антител у инфицированных вирусом ЧМЖ коз и овец может быть использована для подтверждения диагноза на основании клинических признаков, но такие антитела могут быть также индуцированы вакцинацией любой из используемых в настоящее время вакцин против ЧМЖ. Рутинно используемые тесты включают реакцию нейтрализации вируса (VN) и конкурентный ИФА (ELISA).

3.1. Реакция нейтрализации вируса (предписанный тест для международной торговли)

Данный тест является чувствительным и специфичным, но занимает много времени. Стандартную реакцию нейтрализации в настоящее время проводят на 96-луночном титрационном микропланшете, хотя можно также использовать роллерные культуры. Предпочтительнее использовать клетки Vero, но можно также использовать первичные клетки почки ягненка.

Для проведения данного тестирования необходимы следующие материалы: суспензии клеток – 600 000/мл; 96-луночные планшеты для культивирования клеток; сыворотки, подлежащие титрованию (инактивированные посредством нагревания до 56°C в течение 30 минут); полная среда для культивирования клеток; вирус ЧМЖ, разведенный до получения 1000, 100, 10 и 1 ТЦД₅₀/мл.

- i) Развести сыворотки крови 1/5, а затем приготовить двукратные серийные разведения в среде для культивирования клеток.
- ii) Смешать 100 мкл вируса в дозе 1000 ТЦД₅₀/мл (для получения 100 ТЦД₅₀ в каждой лунке) и 100 мкл указанного разведения сыворотки (используя шесть лунок на одно разведение) в лунках планшета для культивирования клеток.
- iii) Предусмотреть наличие серии контрольных лунок для вируса и неинфицированных клеток следующим образом: шесть лунок по 100 ТЦД₅₀ (100 мкл) на лунку; шесть лунок по 10 ТЦД₅₀ (100 мкл) на лунку; шесть лунок по 1 ТЦД₅₀ (100 мкл) на лунку; шесть лунок по 0,1 ТЦД₅₀ (100 мкл) на лунку; и шесть лунок по 200 мкл не содержащей вирус культуральной среды на лунку.
- iv) Довести объем содержимого лунок с разведениями вируса до 200 мкл с помощью полной культуральной среды и инкубировать планшеты в течение одного часа при 37°C.
- v) Добавить 50 мкл клеточной суспензии в каждую лунку, слегка постучать по сторонам планшета для распределения клеток по лунке и покрыть планшеты. Инкубировать планшеты при 37°C в присутствии CO₂.
- vi) Произвести считывание планшетов после инкубации в течение 1 и 2 недель. Результаты должны быть следующими:

Если разведение вируса было произведено правильно, все лунки с контролем вируса, содержащие 100 и 10 ТЦД₅₀/в лунке будут демонстрировать ЦПД, для разведения 1 ТЦД₅₀/в лунке ЦПД будет наблюдаться в 50% лунок, в лунках с разведением 0,1 ТЦД₅₀/в лунке ЦПД должно отсутствовать во всех лунках. Тест будет достоверным только в том случае, если разведение вируса произведено соответствующим образом.

Для титрования сыворотки крови, ЦПД будет отсутствовать в лунках, если указанный вирус был нейтрализован сывороткой крови во время теста; наличие ЦПД любой степени означает, что указанный вирус не был нейтрализован

сывороткой крови. Нейтрализующий титр представляет собой разведение сыворотки крови, которое нейтрализует вирус в половине лунок. Нейтрализующий титр выше 10 является положительным.

3.2. Конкурентный твердофазный иммуоферментный анализ (кИФА)

Было описано несколько конкурентных ИФА (кИФА) на основе использования МАbs, которые распознают белки вируса. Они бывают двух типов: ИФА, в которых МАb распознают N белок и в качестве антигена используется рекомбинантный N белок, продуцированный в бакуловирусе (например, Libeau *et al.*, 1995); и ИФА, в состав которых входят МАb специфичные для белка прикрепления вируса (H) и антиген, состоящий из очищенного или частично очищенного вируса ЧМЖ (вакцинный штамм) (например, Anderson & McKay, 1994; Saliki *et al.*, 1993). Принцип работы всех анализов состоит в том, что антитела к вирусу ЧМЖ могут блокировать связывание МАb с антигеном.

Референтные лаборатории МЭБ по ЧМЖ могут предоставить рекомендации по использованию и применимости методов ИФА. Для некоторых методов имеются в продаже коммерческие тест-наборы: они являются единственным практически целесообразным способом проведения указанного теста. Прежде чем использовать какой-либо из указанных наборов, лаборатории должны убедиться, что данный тест-набор валидирован в соответствии со Стандартом валидации МЭБ. (см. Глава 1.1.5 Принципы и методы валидации диагностических тестов для инфекционных болезней). Единственным альтернативным вариантом для лаборатории может быть создание и валидация всех реагентов (моноклональные антитела и антигены) у себя в лаборатории.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общая информация

Руководство по производству ветеринарных вакцин изложено в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководство, изложенное ниже и в главе 1.1.8, является намеренно общим по своей природе и может быть дополнено национальными и региональными требованиями.

1.1. Обоснование и предполагаемое использование продукта

У овец и коз, вакцинированных аттенуированным штаммом вируса ЧМЖ или переболевших ЧМЖ развивается активный пожизненный иммунитет против болезни (Durojaiye, 1982). В настоящее время имеется несколько гомологичных вакцин против ЧМЖ на основе аттенуированных в клеточной культуре штаммов природного вируса ЧМЖ (Sen *et al.*, 2010). В 1998 г., Всемирная ассамблея МЭБ (формально Международный комитет МЭБ) одобрила использование такой вакцины в странах, которые приняли решение следовать по «пути МЭБ» в сфере эпизоотологического надзора за чумой КРС для того, чтобы избежать путаницы при проведении серологических обследований. Также имеется три опубликованных отчета по предварительным результатам использования рекомбинантных вакцин против ЧМЖ на основе вируса оспы коз, которые способны защищать как от оспы

коз, так и от ЧМЖ (Berhe *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Diallo *et al.*, 2002). В данном разделе описано производство и валидация вакцины из имеющегося в продаже аттенуированного вируса ЧМЖ.

2. Основные принципы производства и минимальные требования для традиционных вакцин

2.1. Характеристика посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

История вакцины, полученной и хранящейся в лаборатории в качестве исходного посевного материала, должна быть хорошо известна и зарегистрирована: происхождение, уровень пассажей в культуре клеток, диапазон количества пассажей вакцины в культуре клеток, которые были протестированы и в отношении которых было показано, что они эффективны в плане предоставления защиты от ЧМЖ у животных, при использовании рекомендуемой дозы вакцины, на срок не менее 3 лет. Данный вакцинный штамм вируса ЧМЖ должен быть неспособен к экскретированию привитыми животными и к распространению на контактных животных. Должно быть доказано, что указанный вакцинный штамм не демонстрировал возврата к вирулентности после, как минимум, трех обратных пассажей на овцах и козах (Diallo *et al.*, 1989).

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие чужеродных антигенов)

Необходимо производить контроль и тестирование посевного материала на отсутствие контаминации бактериями, грибами и микоплазмами. Данный посевной материал следует также протестировать на отсутствие пестивируса и других известных посторонних вирусов. Должен присутствовать только аттенуированный вирус ЧМЖ. Посевной материал должен быть протестирован на безвредность на животных (грызуны, овцы и козы) с удовлетворительными результатами, и должна быть продемонстрирована его эффективность в плане защиты овец и коз от ЧМЖ при введении в рекомендуемой дозе.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

Производитель сразу же после получения образцов из учреждения, где хранится банк вакцины против ЧМЖ – исходный посевной материал, должен подготовить партии первичного и вторичного рабочих посевных материалов. Приготовление партии производственного посевного материала, из которой производится конечная вакцина, осуществляется из вторичного рабочего посевного материала. При приготовлении первичного и вторичного посевных материалов отпадает необходимость проведения большого количества пассажей в ходе производства вакцины. И при этом можно обеспечить выполнение одной из рекомендаций МЭБ: максимум 5–10 пассажей после исходного посевного материала (см. Главу 1.1.8).

i) Партии первичного и вторичного рабочего посевного материала:

При подготовке партий первичного и вторичного рабочего посевного материала важно не допускать инфицирования клеток высокими дозами вируса (высокая множественность заражения [m.o.i.]), поскольку это приведет к накоплению дефектных частиц в произведенной суспензии вируса, что будет снижать титр последующих продуктов. С другой стороны, очень низкая множественность заражения (например, 0,0001) будет увеличивать время культивирования.

Лиофилизированное содержимое сосуда с исходным посевным материалом восстанавливают с помощью 2 мл бессывороточной среды для культивирования клеток. Данную жидкость смешивают с клетками Vero, если вакцина производится на клетках Vero, суспендируют в полной культуральной среде для получения, как минимум, 0,001 ТЦД₅₀/клетку. Сосуды для культивирования клеток наполняют данным вирусом/клеточной смесью (примерно 2×10^7 клеток Vero в 175 см² сосуде), и инкубируют при 37°C. Культивируемые клетки регулярно исследуют с целью выявления ЦПД. Среду обновляют каждые 2 дня, снижая долю сыворотки до 2%, как только завершается формирование клеточного монослоя. В первый раз урожай вируса собирают при наличии 40–50% ЦПД. Вирусную суспензию хранят при –70°C. Последующий сбор вируса осуществляют каждые два дня до тех пор, пока ЦПД не достигнет 70–80%, что является временем для конечного замораживания культуральных сосудов (в целом, до конечного замораживания культуральных сосудов можно произвести, как минимум, два дополнительных сбора урожая вируса). Все суспензии собранного вируса подвергают двум циклам замораживания-оттаивания, а затем объединяют в одну партию, которая служит партией рабочего посевного материала. Её разделяют на малые объемы, помещают во флаконы и хранят при –70°C. Содержимое пяти сосудов оттаивают и титруют (минимальный требуемый титр: 10⁵ ТЦД₅₀/мл). Лучше всего лиофилизировать данный посевной материал, чтобы хранить его при –20°C. В данном случае необходимо будет провести титрование лиофилизированного вируса (пять флаконов). Составленная таким образом партия должна пройти все тесты на стерильность.

ii) Приготовление партии производственного посевного материала

Приготовление партии производственного посевного материала осуществляется в тех же условиях, что и приготовление партии рабочего посевного материала, кроме того, что заражение клеток можно производить с более высокой множественностью заражения (m.o.i.) по сравнению с предыдущими случаями, которая обычно составляет не менее m.o.i. 1–10. Формируется большой запас вируса, из которого будет производиться конечная вакцина. Данная партия распределяется по емкостям и хранится при –70°C. Она должна удовлетворять требованиям тестов на стерильность. Титруют пять образцов (минимальный требуемый титр: 10⁶ ТЦД₅₀/мл).

iii) Валидация в качестве вакцины

Необходимо подтверждать или исключать присутствие вируса ЧМЖ в тестируемом продукте. В этих целях используется сыворотка крови против вируса ЧМЖ для нейтрализации вируса в клеточной культуре.

• **Процедура теста:**

- a) Смешать содержимое двух флаконов с вакциной со стерильной дважды дистиллированной водой для получения объема, равного объему до лиофилизации.
- b) Приготовить десятикратные разведения восстановленной вакцины в бессывороточной культуральной среде (0,5 мл вирусной суспензии + 4,5 мл среды).
- c) Приготовить две серии смесей для разведений вируса из каждого флакона на 96-луночном планшете следующим образом:

Серия 1	Разведения суспензии вируса	-1	-2	-3	-4
	Суспензия вируса (в мкл)	50	50	50	50
	Культуральная среда (в мкл)	50	50	50	50
Серия 2	Разведения суспензии вируса	-1	-2	-3	-4
	Суспензия вируса (в мкл)	50	50	50	50
	Антисыворотка против вируса ЧМЖ (в мкл)	50	50	50	50

(Примечание: Антисыворотку против вируса ЧМЖ, используемую для этой цели, получают на козах и лиофилизируют. Её восстанавливают с помощью 1 мл стерильной дважды дистиллированной водой в разведении 1/10.)

- d) Инкубировать смеси при 37°C в течение одного часа.
- e) Добавить в каждую лунку 100 мкл клеток, суспендированных в полной культуральной среде (30 000 клеток/лунку).
- f) Инкубировать микропланшет при 37°C в присутствии CO₂.
- g) Произвести считывание планшета через 7-10 дней инкубации.

Обычно ЦПД присутствует только в лунках, содержащих клетки, инфицированные смесью вируса и культуральной среды. При обнаружении ЦПД в лунках Серии 2, необходимо будет произвести идентификацию вируса ЧМЖ посредством иммунофлуоресценции (специфичные для вируса ЧМЖ МАб, и тест-набор с иммунозахватом можно получить из Референтной лаборатории МЭБ по ЧМЖ во Франции [см. таблицу, указанную в Части 4 данного Руководства по наземным животным]). Если данная идентификация подтверждает присутствие вируса ЧМЖ, то это указывает на то, что используемая антисыворотка против вируса ЧМЖ слишком слабая, или что партия должна быть заменена. Если иммунофлуоресценция или иммунозахват дают отрицательные результаты, то тогда присутствует контаминация вирусом, и данный материал подлежит уничтожению.

- iv) Производство вакцины

Вакцины производят большими партиями. Клетки можно заражать вирусом с помощью множественного заражения (m.o.i.), как это было ранее, или высокими дозами вплоть до 0.01. Продукты, собранные в результате различных посевов, соединяют после двух циклов замораживания-оттаивания (для получения конечного продукта) и хранят при -70°C в ожидании результатов титрования и тестов на стерильность. Если результаты удовлетворительны, то вакцину лиофилизируют.

v) Лиофилизация

Среда для лиофилизации (Вейбридж) состоит из 2.5% (вес/объем) лактальбумина, 5% (в/о) сахара и 1% (в/о) глутамат натрия, рН 7.2. Указанную среду добавляют к равному объему вирусной суспензии для лиофилизации (которую заранее можно развести для получения желаемого объема вакцинных доз на флакон). Полученную в результате смесь хранят в охлажденном состоянии, в гомогенизированном виде, затем распределяют по флаконам и лиофилизируют. В конце цикла лиофилизации прикрепляют зонд и выдерживают его при 35°C в течение 4 часов. После этого флаконы укупоривают в вакууме. Образцы препарата из конечной партии, отобранные методом случайной выборки, (например 5% от партии) тестируют на параметры безвредности, эффективности и стерильности, объем остаточной влаги рассчитывают методом Карла Фишера (оптимум $\leq 3,5\%$). При неудовлетворительных результатах, всю партию уничтожают.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

- (i) Клетки: Клетки, используемые для производства вакцины против ЧМЖ должны быть свободны от бактерий, грибков и вирусов. Клетки должны быть получены из зарегистрированных и известных источников.
- (ii) Сыворотка: Сыворотка, используемая в культуре клеток, должна быть свободна от случайных вирусов, в частности от пестивирусов. Рекомендуется использовать сыворотку, прошедшую обработку излучением. Должна быть известна страна происхождения сыворотки (следует избегать использования сыворотки из стран с высоким риском заражения трансмиссивными губкообразными энцефалопатиями (ТГЭ)).
- (iii) Культуральная среда: Культуральная среда состоит из минимальной поддерживающей среды (MEM) с добавлением антибиотиков (например, пенициллин + стрептомицин в конечной концентрации 100 международных единиц ([Международные единицы]/мл и 100мкг/мл, соответственно)), противогрибкового компонента (нистатин [Микостатин] в конечной концентрации 50 мкг/мл). Среду обогащают 10% фетальной телячьей сывороткой (полная среда) для клеточного роста. Долю сыворотки уменьшают до 2% для поддерживающей среды, когда сформирован клеточный монослой.

2.2.3. Производственный контроль

Необходимо проверить внешний вид клеток, используемых в культурах. Клетки должны быть свободны от вирусов, в особенности от вируса диареи КРС. На посевной серии должна быть проведена титрация вируса: с использованием (MEM) (бессывороточной) среды; серию десятикратных разведений снижают (0,5 мл вируса +

4,5 мл разбавителя) до 10^{-6} продукта, подлежащего титрации. Клетки Vero из одного флакона трипсинизируют и суспендируют в полной культуральной среде при 300 000/мл. Далее их распределяют по 96-луночному планшету (30 000 клеток на лунку, что равнозначно 100 мкл клеточной суспензии). Затем 100 мкл десятикратного разведения вируса добавляют к клеткам (разведения в диапазоне от 10^{-2} до 10^{-6}). Один ряд лунок используют в качестве контроля для незараженных клеток, к которым добавляют свободную от вирусов культуральную среду (100 мкл). Планшет инкубируют при 37 °С в присутствии CO₂. Показания считывают с планшетов на 7-10 день после заражения (путем проверки цитопатогенного эффекта).

Титр вируса определяют методом Spearman-Kärber.

2.2.4. Исследования партий готовой продукции

i) Стерильность и чистота

Описание тестов на стерильность и свободу от контаминации биологическими материалами можно найти в Главе 1.1.9.

Содержимое одного контейнера от каждой расфасованной партии должно быть проверено на идентичность по содержащейся в препарате культуре после нейтрализации специфической антисывороткой.

Необходимо доказать в ходе тестов, что препарат не контаминирован бактериями, грибами или иными вирусами. Тестирование следует проводить на клетках и сыворотках до их использования в производстве вакцины и на посевном материале и вакцине до и после лиофилизации. Все продукты, которые не прошли тест на стерильность, уничтожаются.

Описание тестов на стерильность и свободу от контаминации биологическими материалами можно найти в Главе 1.1.9.

ii) Безопасность и эффективность

Тест на безопасность следует проводить на грызунах для выявления неспецифической токсичности, связанной с продуктом, и также на реципиентах вакцины, т.е. на овцах и козах.

Грызуны: шесть морских свинок, каждая весом 200-250 г; десять не отлученных от матки мышей (17-22 г, швейцарская линия или похожая). Следует смешать содержимое пяти флаконов вакцины и далее использовать эту смесь. Вакцину (0,5 мл) вводят внутримышечно в заднюю конечность двум морским свинкам; 0,5 мл в брюшную полость двум морским свинкам и 0,1 мл в брюшную полость шести мышам. В качестве контроля используют двух непривитых морских свинок и четырех непривитых мышей. Животных наблюдают в течение 3 недель. Если погибает одна морская свинка или две мыши, то тест необходимо повторить. Далее следует вскрытие умерших животных для установления причины смерти. Необходимо записать все результаты. Считается, что вакцина демонстрирует удовлетворительные результаты, если во время первого и второго теста

как минимум 80% животных остаются здоровыми в течение периода наблюдения и при вскрытии не обнаруживают никаких патологических изменений.

Обычная минимальная прививная доза составляет 100х, наименьшая доза вакцинного вируса, способная вызвать 50% иммунный ответ. Например, в случае с аттенуированной вакциной на основе штамма Нигерия 75/1 минимально необходимый титр вируса на дозу составляет $10^{2.5}$ ТЦД₅₀.

Чтобы провести целенаправленное тестирование на безопасность для реципиента, вакцину против ЧМЖ необходимо восстановить с использованием физиологического раствора. Смешанное содержимое пяти флаконов восстанавливают в разбавителе до получения растворов 100 доз/мл и 0,1 доза /мл. Используют шесть коз и шесть овец, приблизительно в возрасте 1 года, свободных от антител к ЧМЖ. Вакцинируют двух коз и двух овец подкожно (100 доз на животное); вакцинируют двух коз и двух овец подкожно (0,1 доза на животное); оставшихся животных используют в качестве контрольной группы. Животных ежедневно проверяют на наличие клинических признаков в течение 3 недель, включая измерение ректальной температуры. В конце указанного периода у всех животных берут кровь для приготовления сывороток. Всех животных подвергают контрольному заражению путем подкожного введения 1 мл суспензии патогенного вируса ЧМЖ, ранее тестированного на предмет его способности вызывать клинические признаки ЧМЖ у овец и коз. Животных следует наблюдать ежедневно в течение двух недель, измеряя температуру тела.

Вакцину считают безопасной, если у вакцинированных животных не обнаружено патологических клинических признаков, в особенности у тех, которые получили самые высокие дозы вакцины.

Эффективность вакцины доказана, если все вакцинированные животные выдерживают контрольное заражение, а контактирующие животные остаются восприимчивыми к вирусу контрольного заражения.

iii) Иммуногенность партии вакцины

Иммуногенность каждой партии следует определять путем титрации вируса в культуре клеток и в тесте на эффективность она должна выполнять минимальные требования к иммунизирующей дозе.

Иммуногенность вакцины подтверждается, если у животных, вакцинированных дозой, используемой в тесте на эффективность (см. выше), вырабатываются антитела против вируса ЧМЖ; когда через 3 недели после вакцинации животных тестируют в реакции вирус нейтрализации при разведении сыворотки $>1/10$. Титрование нейтрализующих антител проводится в соответствии с описаниями в разделе В.3.1.

Возможно отсутствие следов сероконверсии у некоторых животных через 3 недели после вакцинации, но они могут демонстрировать резистентность во время контрольного заражения, если вакцина эффективна. Резистентность в этих случаях связана с клеточно-опосредованным иммунитетом, вызванным вирусом ЧМЖ (Saravanan et al., 2010).

2.3. Требования к выдаче разрешения

2.3.1. Требования к безопасности

i) Безопасность для целевых и нецелевых животных

Вакцина должна быть безопасной для всех видов целевых животных, включая молодняк и беременных самок.

ii) Реверсия вирулентности у аттенуированных/живых вакцин

Необходимо предоставить информацию о проведенных исследованиях, демонстрирующих, что использованный вакцинный штамм не восстановил вирулентность после минимум трех обратных пассажей.

iii) Учет воздействия на окружающую среду

Привитые животные не должны выделять во внешнюю среду вакцину против ЧМЖ.

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

Полевые и иные испытания должны доказать, что аттенуированная вакцина против ЧМЖ безопасна для всех видов овец и коз, включая молодняк и беременных самок.

ii) Для борьбы и искоренения

Овцы и козы, которые выздоровели после заражения ЧМЖ, защищены от последующей инфекции на протяжении всей жизни. Нейтрализующие антитела против вируса ЧМЖ обнаруживали у овец и коз на протяжении трех лет после вакцинации аттенуированными вакцинами против ЧМЖ (штамм Нигерия 75/1). Другие аттенуированные вакцины против ЧМЖ, разработанные в Индии, также вызывали сильный иммунитет (Saravanan et al., 2010; Sen et al., 2010). Представленная информация показывает, что ЧМЖ можно успешно контролировать, и даже искоренить в результате массовой и тщательно спланированной вакцинации, как это было сделано в случае с чумой КРС. Есть пример того, как стране удалось успешно применить данную стратегию.

2.3.3. Стабильность

Вакцина против ЧМЖ, лиофилизированная в среде Вейбридж может храниться в течение минимум 2 лет при температуре 2-8 °C (хотя лучше хранить при - 20°C), в вакууме и в защищенном от света месте.

2.3.4. Вакцины, допускающие стратегию DIVA (выявление заражения у вакцинированных животных)

В настоящее время нет DIVA вакцины и ассоциированного с ней теста для использования в полевых условиях.

2.3.5. Продолжительность иммунитета

Продолжительность иммунитета следует определять для каждого вакцинного штамма в испытаниях на животных. Для вакцины на основе штамма Нигерия 75/1 продолжительность иммунитета составила как минимум 3 года.

3. Вакцины на основе биотехнологии

3.1. Имеющиеся вакцины и их преимущества

Предварительные результаты по вакцинам против ЧМЖ на основе рекомбинантного вируса оспы овец показывают, что эти вакцины могут защитить как от вируса оспы овец, так и от ЧМЖ (Berne et al., 2003; Diallo et al., 2002, Chen et al., 2010). Пока они не прошли валидацию для использования в полевых условиях.

3.2. Особые требования к вакцинам на основе биотехнологии (если таковые имеются)

Нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ADOMBI C.M., LELENTA M., LAMIEN C.E., SHAMAKI D., YAO K., TRAORÉ A., SILBER R., COUACY-HYMANN E., BODJO C., DJAMAN J.A., LUCKINS A. & DIALLO A. (2011). Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *J. Virol. Methods*, 173, 306–313.

ANDERSON J. & MCKAY J.A. (1994). The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implication to rinderpest control programmes. *Epidemiol. Infect.*, 112, 225–234.

BANYARD A.C., PARIDA S., BATTEN C., OURA C., KWIATEK O. & LIBEAU G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J. Gen. Virol.*, 91, 2885–2897.

BAO J., LI L., WANG Z., BARRETT T., SUO L., ZHAO W., LIU Y., LIU C. & LI J. (2008). Development of one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of peste des petits ruminants virus. *J. Virol. Methods*, 148, 232–236.

BATTEN C.A., BANYARD A.C., KING D.P., HENSTOCK M.R., EDWARDS L., SANDERS A., BUCZKOWSKI H., OURA C. A. L. & BARRETT T. (2011). A real-time PCR assay for the specific detection of peste des petits ruminants virus. *J. Virol. Methods*, 171 (2), 401–404.

BERHE G., MINET C., LE GOFF C., BARRETT T., NGANGNOU A., GRILLET C., LIBEAU G., FLEMING M., BLACK D.N. & DIALLO A. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petitsruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol.*, 77, 1571–1577.

CHEN W., HU S., QU L., HU Q., ZHANG Q., ZHI H., HUANG K. & BU, Z. (2010). A goat poxvirus-vectored peste-despetits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. *Vaccine*, 28 (30), 4742–4750.

- COUACY-HYMANN E., HURARD C., GUILLOU J.P., LIBEAU G. & DIALLO A. (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods*, 100, 17–25.
- DIALLO A., MINET C., BERHE G., LE GOFF C., BLACK D.N., FLEMING M., BARRETT T., GRILLET C. & LIBEAU G. (2002). Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann. NY Acad. Sci.*, 969, 88–91.
- DIALLO A., TAYLOR W.P., LEFEVRE P.C. & PROVOST A. (1989). Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue vivant. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 42, 311–319. DUROJAIYE O.A. (1982). Precipitating antibody in sera of goats naturally affected with peste des petits ruminants. *Trop. Anim. Health Prod.*, 14, 98–100.
- DUROJAIYE O.A., OBI T.U. & OJO O. (1983). Virological and serological diagnosis of peste des petits ruminants. *Trop. Vet.*, 1, 13–17.
- FORSYTH M.A. & BARRETT T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste de petit ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.*, 39, 151–163.
- GARGADENNEC L. & LALANNE A. (1942). La peste des petits ruminants. *Bull. Serv. Zoo. A.O.F.*, 5, 15–21.
- GEORGE A., DHAR P., SREENIVASA B.P., SINGH R.P. & BANDYOPAHYAY S.K. (2006). The M and N genes based simplex and multiplex PCRs are better than the F or H gene based simplex PCR for peste des petits ruminants virus. *Acta. Virol.*, 50, 217–222.
- GIBBS E.P.J., TAYLOR W.P., LAWMAN M.J.P. & BRYANT J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus. *Intervirolgy*, II, 268–274.
- KWIATEK O., KEITA D., GIL P., FERNANDEZ-PINERO J., JIMENEZ CLAVERO M.A., ALBINA E. & LIBEAU G. (2010). Quantitative one-step real-time RT-PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV. *J Virol. Methods*, 165, 168–177.
- LEFEVRE P.C. & DIALLO A. (1990). Peste des petits ruminants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 9, 951–965.
- LI L., BAO J., WU X., WANG Z., WANG J., GONG M., LIU C. & LI J. (2010). Rapid detection of peste des petits ruminants virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Virol. Methods*, 170 (1–2), 37–41.
- LIBEAU G., DIALLO A., COLAS F. & GUERRE L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, 134, 300–304.
- LIBEAU G., PREHAUD C., LANCELOT R., COLAS F., GUERRE L., BISHOP D.H.L. & DIALLO A. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res. Vet. Sci.*, 58, 50–55.

MAJIYAGBE K.A., NAWATHE D.R. & ABEGUNDE A. (1984). Rapid diagnosis of PPR infection, application of immunoelectro-osmophoresis (IEOP) technique. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 37, 11–15.

MARTRENCAR A., ZOYEM N. & DIALLO A. (1997). Experimental study of a mixed vaccine against “peste des petits ruminants” and capripox infection in goats in northern Cameroon. *Small Rumin. Res.*, 26, 39–44.

SALIKI J.T., LIBEAU G., HOUSE J.A., MEBUS C.A. & DUBOVI E.J. (1993). Monoclonal antibody-based blocking enzymelinked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste-des-petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1075–1082.

SARAVANAN P., SEN A., BALAMURUGAN V., RAJAK K.K., BHANUPRAKASH V., PALANISWAMI K.S., NACHIMUTHU K., THANGAVELU A., DHINAKARRAJ G., HEGDE R. & SINGH R.K. (2010). Comparative efficacy of peste des petits ruminants (PPR) vaccines. *Biologicals*, 38 (4), 479–485.

SARAVANAN P., SINGH R.P., BALAMURUGAN V., DHAR P., SREENIVASA B.P., MUTHUCHELVAN D., SEN A., ALEYS A.G., SINGH R.K. & BANDYOPADHYAY S.K. (2004). Development of an N gene-based PCR-ELISA for detection of Pestedes-petits-ruminants virus in clinical samples. *Acta Virol.*, 48, 249–255.

SARKAR J., SREENIVASA B.P., SINGH R.P., DHAR P. & BANDYOPADHYAY S.K. (2003). Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Vaccine*, 21 (32), 4728–4735.

SEN A., SARAVANAN P., BALAMURUGAN V., RAJAK K. K., SUDHAKAR S. B., BHANUPRAKASH V., PARIDA S. & SINGH R. K. (2010). Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Rev. Vaccines*, 9 (7), 785–796.

SINGH R.P., SREENIVAS B.P., DHAR P. & BANDYOPADHYAY S.K. (2004) .A sandwich-ELISA for the diagnosis of Peste des petits ruminants (PPR) infection in small ruminants using anti-nucleocapsid protein monoclonal antibody. *Arch. Virol.*, 149, 2155–2170.

* * *

NB: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по чуме мелких жвачной (см. Таблицу в Части 4 этого Наземного Руководства или см. веб-сайт МЭБ, чтобы увидеть самый последний список: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Свяжитесь со Справочными лабораториями МЭБ для получения любой дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против чумы мелких жвачных