

РЕЗЮМЕ

Оспа овец и оспа коз - вирусные болезни овец и коз, характеризующиеся лихорадкой, образованием папул или узелков, пустул (редко), внутренних поражений (в частности, в легких), с летальным исходом. Обе болезни вызывают штаммы каприпоксвируса, которые могут инфицировать овец и коз. Хотя большинство исследованных штаммов являются причиной проявления более тяжелой клинической формы болезни как у овец, так и у коз, были выделены некоторые штаммы одинаково патогенные для обоих видов животных.

Вирус оспы овец (SPPV) и вирус оспы коз (GTPV) – возбудители оспы овец и оспы коз и вирус нодулярного дерматоза рода Capripoxvirus семейства Poxviridae. Оспа овец и оспа коз эндемичны в Африке к северу от экватора, на Среднем Востоке и в Азии, а в некоторых частях Европы недавно прошли вспышки этих болезней. Страны, заявившие о вспышках болезни в период с 2010 по 2015 гг.: Болгария, китайский Тайбей, Израиль, Казахстан, Кыргызстан, Монголия, Марокко, Греция и Россия, причем в Греции, Израиле и России наблюдались рецидивы болезни.

Идентификация возбудителя: *Лабораторное подтверждение наличия каприпоксвируса проводят сверхбыстро с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в сочетании со сбором истории болезни, указывающей на генерализованную каприпоксвирусную инфекцию. Выделение данного вируса возможно после выращивания каприпоксвирусов на тканевой культуре овец, коз или КРС, хотя полевым изолятам может потребоваться до 14 дней для роста или один или более дополнительных пассажей тканевых культур. Вирус вызывает образование внутрицитоплазматических включений, которые четко видны при окрашивании гематоксилином и эозином. Антиген также можно выявить в тканевой культуре с использованием специфичных сывороток и иммунопероксидазного метода или метода иммунофлюоресценции. Антиген к каприпоксвирусу и включения наблюдаются на окрашенных криостатных или парафиновых срезах материала, полученного в результате биопсии или аутопсии патологического материала.*

Разработан твердофазный иммуноферментный метод (ИФА) для выявления антигенов с использованием поликлональной детектирующей сыворотки к рекомбинантному иммунодоминантному антигену каприпоксвируса.

Серологические исследования: *Наиболее специфичным серологическим тестом является реакция вируснейтрализации. Реакция непрямой иммунофлюоресценции менее специфична, в связи с перекрестными реакциями с антителами к другим вирусам оспы. Метод вестерн-блоттинга с использованием реакции между Р32 антигеном каприпоксвируса и тест-сывороткой является как чувствительным, так и специфичным, однако он дорогостоящ и затруднителен для проведения. Проведение приемлемого и стандартизированного серологического теста в будущем возможно благодаря использованию в ИФА данного антигена или других экспрессированных соответствующим вектором антигенов.*

Требования к вакцинам: *Живые и инактивированные вакцины используют для борьбы с каприпоксвирусом. Все на настоящее время изученные штаммы каприпоксвируса имеют общую главную область нейтрализации, а некоторые обладают перекрестной защитой. Инактивированные вакцины обеспечивают, в лучшем случае, лишь кратковременный иммунитет.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Род *Capripoxvirus* в семействе *Poxviridae*, состоит из трех видов – вирус нодулярного дерматита, который вызывает болезнь исключительно у КРС (см. Главу 2.4.13), вирус оспы овец (SPPV) и вирус оспы коз (GTPV), которые вызывают соответственно оспу овец и оспу коз. Оспа овец и оспа коз характеризуются возникновением диссеминированных узелков на коже и почти 100% смертностью у полностью восприимчивых пород овец и коз. У местных животных генерализованная форма болезни и смертность наблюдаются менее часто, и все же возникает в регионах или областях, где болезнь отсутствовала в течение некоторого времени при введении интенсивных методов сельского хозяйства, или при сочетании с другими возбудителями болезни, такими как вирус чумы мелких жвачных животных или вирус ящура. Оспа овец и оспа коз являются основными ограничителями выведения экзотических пород овец и коз в эндемичных регионах и для развития интенсивного животноводства.

Штаммы SPPV и GTPV могут передаваться от овец козам и наоборот, хотя большинство вызывают более тяжелые клинические формы болезни только у одного вида. SPPV и GTPV являются трансграничными болезнями, которые регулярно распространяются на сопредельные, неэндемичные территории. Оспа овец и оспа коз эндемичны в Африке к северу от экватора и в странах Среднего Востока и Азии (см. OIE WAHIS для получения последней информации о распространении (<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/wahis-portal-animal-health-data/>)). Сообщалось о вспышках в неэндемичных странах Азии, Европы и Среднего Востока.

Инкубационный период развития оспы овец и оспы коз составляет от 8 до 13 дней после контакта между инфицированными и восприимчивыми животными. Данный период может составлять 4 дня после экспериментального заражения путем внутрикожного введения или механической передачи насекомыми. Некоторые породы Европейских овец, такие как Soay, могут погибать от острой инфекции до начала развития кожных поражений. У других пород наблюдается начальное повышение ректальной температуры до значений выше 40°C, с последующим, через 2-5 дней, образованием сначала макул – небольших контурированных гиперемизированных участков, которые наиболее заметны на непигментированной коже, а затем папул – твердых припухлостей диаметром от 0,5 до 1 см, которые могут покрывать тело или ограничиваться зонами паха, промежности и подмышечных впадин. Папулы могут покрываться наполненными жидкостью везикулами, однако это происходит редко. Некоторые исследователи дифференцируют везикулярную и нодулярную формы оспы овец и оспы коз (Zro et al., 2014b).

В течение 24 часов после возникновения генерализованных папул, у пораженных животных развивается ринит, конъюнктивит и увеличение всех поверхностных лимфатических узлов, в частности, предлопаточных лимфатических узлов. Папулы на веках вызывают блефарит различной степени тяжести. Вследствие поражения папулами слизистых оболочек глаз и носа, выделения становятся слизисто-гнойными, наблюдается некроз слизистых оболочек рта, ануса и препуция или вагины. Дыхание становится затрудненным и шумным в связи с давлением отекавших ретрофарингальных лимфатических узлов на верхние органы дыхательных путей вследствие развития поражения легких.

Если пораженное животное не умирает во время острой фазы болезни, папулы приобретают некротический характер, развиваясь из ишемического некроза, с последующим образованием тромбов в кровяных сосудах у основания папулы. В последующие 5-10 дней на папулах образуются корочки, которые сохраняются в течение периода до 6 недель, оставляя небольшие рубцы. Поражения кожи восприимчивы к зараженности мушиными яйцами, часто развивается вторичная пневмония. Анорексия наблюдается нечасто до тех пор, пока поражения в ротовой полости не начнут физически препятствовать кормлению. Аборты наблюдаются редко.

При посмертном обследовании животных, имевших острую форму заражения, поражения кожи часто менее очевидны, чем у живых животных. Слизистые оболочки омертвевают, и все лимфатические узлы на теле увеличиваются и отекают. Папулы, которые могут быть изъязвлены, могут часто образовываться на слизистых оболочках сычуга и иногда на стенках рубца и толстой кишки, на языке, на твердом и мягком нёбе, на трахее и пищеводе. Бледные участки, приблизительно диаметром 2 см, могут иногда наблюдаться на поверхности почек и печени, имеются сообщения о наличии таких участков на семенниках. Множественные уплотнения, диаметром до 5 см, обычно наблюдаются на легких, но в особенности в диафрагмальных долях.

Клинические признаки и посмертные поражения значительно варьируют, в зависимости от породы хозяина и штамма каприпоксвируса. Местные породы менее восприимчивы и у них часто наблюдаются только небольшие поражения, которые можно спутать с укусами насекомых или контактиозным пустулярным дерматитом. Однако у ягнят, утративших материнский иммунитет, животных, содержащихся изолированно, и животных, выросших в эндемичных зонах из изолированных деревень, особенно, если они подвергались стрессу в результате перемещения на длинные расстояния и смешению с другими овцами и козами и их патогенами, часто наблюдается генерализованная и иногда летальная форма каприпоксвирусной инфекции. Неизменной остается высокая смертность у незащищенных импортируемых пород овец и коз после заражения каприпоксвирусной инфекцией. Инфекционность каприпоксвируса для человека не выявлена.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований для проведения диагностики оспы овец и оспы коз и их цели

| Метод | Цель | | | | | |
|--|---------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| | Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельных животных до перемещения | Содействие политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Превалентность инфекции - надзор | Иммунный статус у отдельных животных или в популяции после вакцинации |
| Идентификация возбудителя¹ | | | | | | |
| Выделение вируса | + | ++ | + | +++ | + | — |
| Выявление антигена | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | — |
| ПЦР | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | — |
| Выявление иммунного ответа | | | | | | |
| РВН | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| IFAT | + | + | + | + | + | + |

Обозначения: +++ = рекомендованный метод, валидированный для указанной цели; ++ = подходящий метод, но может требовать дополнительной валидации; + = может использоваться в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или иные факторы значительно ограничивают его применение; — = не подходит для данной цели; n/a = не применяется. ПЦР = полимеразная цепная реакция; РВН = реакция вируснейтрализации; РНИФ = реакция непрямой иммунофлуоресценции.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Отбор и предоставление образцов

Материал для выделения вируса и выявления антигена получают путем биопсии или после смерти из папул на коже, поражений на легких или лимфатических узлов. Образцы для

¹ Рекомендуется проводить несколько методов идентификации возбудителя на одном клиническом образце.

выделения вируса и выявления антигена с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) собирают в течение первой недели с момента появления клинических признаков, до начала выработки нейтрализующих антител. Образцы для выявления генома путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) собирают до и после выработки нейтрализующих антител. Лейкоцитарную пленку крови, внесенную в EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) во время вирусемической стадии заражения каприпоксвирусом (до генерализации поражений или в течение 4 дней генерализации), можно также использовать для выделения вируса. Образцы для гистологии должны содержать ткань из окружающей области и их незамедлительно после отбора помещают в 10-кратно превышающий объем образца 10% формалиновый раствор или нейтральный забуференный 10% раствор формала.

К транспортировке тканей в формалине не предъявляется специальных требований. Образцы крови, для выделения вируса из лейкоцитарной пленки, помещают в пробирку с антикоагулянтом, которую сразу помещают на лед и незамедлительно обрабатывают. На практике, образцы крови хранят при 4°C до 2 дней до обработки, но их не следует замораживать или хранить при температуре окружающей среды. Ткани и сухие корочки для выделения вируса, выявления антител и выявления генома предпочтительно хранить при 4°C, на льду или при - 20°C. При необходимости осуществить транспортировку образцов на большие расстояния без холодильника, среда должна содержать 10% глицерин; образцы должны быть достаточного размера, чтобы транспортная среда не проникала в центральную часть биопсийного материала, которая будет использована для выделения/выявления вируса.

1.2. Выделение вируса

Патологический материал, предназначенный для выделения вируса и выявления антигенов, гомогенизируют. Пример одного из методов для проведения гомогенизации: Ткань измельчают стерильными ножницами и щипцами, затем мацерируют в мельнице-смешивателе со стальными шариками или стерильным пестиком в ступке со стерильным песком и равным объемом стерильного фосфатно-буферного раствора (ФБР) или модифицированной среды Игла (MEM), с натрий-пенициллином (1000 международных единиц [МЕ]/ мл, сульфатом стрептомицина (1 мг/мл), микостатином (100 МЕ/мл) или фунгизолом (2,5 мкг/мл) и неомицином (200МЕ/мл). Гомогенизированную суспензию трижды замораживают-оттаивают, а затем частично очищают центрифугированием в настольной центрифуге при 600g в течение 10 минут. В случаях, когда предполагается бактериальная контаминация образца (когда, вирус выделяют из образцов кожи), надосадочную жидкость фильтруют через фильтр с порами 0,45 мкм после центрифугирования, однако, количество вируса в надосадочной жидкости может сократиться. Лейкоцитарные пленки можно приготовить из 5-8 мл некоагулированной крови путем центрифугирования при 600g в течение 15 минут; затем лейкоцитарные пленки осторожно переносят в 5 мл холодной воды двойной дистилляции с использованием стерильной пипетки Пастера. Через 30 секунд добавляют 5 мл холодной питательной среды двойной концентрации и перемешивают. Смесь центрифугируют при 600g в течение 15 минут, надосадочную жидкость отбрасывают, а клеточный осадок суспендируют в 5мл питательной среды, такой как модифицированная по методу Глазго среда Игла (GMEM). После центрифугирования при 600g в течение 15 минут, полученный осадок суспендируют в 5 мл свежеприготовленной GMEM. Или же, лейкоцитарные пленки можно отделить от гепаринизированного образца с помощью градиента плотности.

Каприпоксвирус выращивают в бычьей, овечьей или козьей тканевой культуре, хотя первичные или вторичные культуры клеток тестикул ягненка (LT) или почки ягненка (LK) считают наиболее восприимчивыми, в особенности, полученные от шерстных пород овец. Пример одного из методов выделения: или 1 мл суспензии лейкоцитарной пленки или 1 мл очищенного супернатанта биопсийного препарата инокулируют в 25 см² колбу для тканевых

культур 90% слитых клеток LT или LK, супернатант абсорбируют в течение 1 часа при 37°C. Затем культуру промывают теплым ФБР и покрывают 10 мл пригодной среды, такой как GMEM, содержащей антибиотика и 2% фетальную телячью сыворотку. При наличии, также происходит инфицирование пробирок для тканевых культур, содержащих LT или LK клетки, и узкие покровные стекла или предметные стекла микроскопа для тканевых культур.

Колбы проверяют ежедневно в течение 7-14 дней на наличие цитопатического действия (ЦПД). Контаминированные колбы отбраковывают. У инфицированных клеток проявляется типичное ЦПД, которое демонстрирует ретракцию клеточной мембраны из окружающих клеток и, в результате, скругление клеток и скопление лейкоцитов по периферии ядерного хроматина. Сначала можно наблюдать только небольшие участки ЦПД, иногда на 4 день после заражения; через 4-6 дней они расширяются, охватывая весь клеточный пласт. Если ЦПД не наблюдается на 7 день, культуру подвергают трехкратной процедуре замораживания-оттаивания, затем очищенный супернатант инокулируют на свежеприготовленную культуру LT или LK. При первых признаках появления ЦПД в колбах или ранее, если используется ряд инфицированных покровных стекол, покровное стекло следует удалить, зафиксировать в ацетоне и окрасить с использованием гематоксилина и эозина. Эозинофильные внутрицитоплазматические тельца-включения, различные по размеру, до не более половины размера ядра, и окруженные четкой каймой, свидетельствуют о заражении вирусом оспы. Образование сцинтий не свидетельствует о наличии каприпоксвирусной инфекции. Если причиной возникновения ЦПД является инфицирование клеточной культуры каприпоксвирусом, его можно предотвратить или отсрочить путем включения в среду специфичной антикаприпоксвирусной сыворотки; это способствует предварительной идентификации возбудителя. Некоторые штаммы каприпоксвируса адаптированы для выращивания на клетках почки африканской зеленой мартышки (Vero), однако они не рекомендуются для первичного посева.

1.3 Электронная микроскопия

Типичный вирион вируса оспы можно визуализировать с использованием методики приготовления с негативным окрашиванием с последующим наблюдением под электронным микроскопом. Существует множество различных протоколов негативного окрашивания, один из примеров приведен ниже:

Материал из исходной тканевой суспензии готовят для исследования на просвечивающем электронном микроскопе, до центрифугирования, путем помещения сетки с шестигранными отверстиями размером 400 меш с пилоформ-углеродным субстратом, активированный тлеющим разрядом в пентиламинном паре, на каплю суспензии, помещенной на парапленку или восковую пластину. Через 1 минуту сетку переносят на каплю буфера Tris/EDTA, pH 7,8, на 20 секунд, а затем на каплю 1% фосфорновольфрамовой кислоты, pH 7,2, на 10 секунд. Сетку просушивают фильтровальной бумагой, высушивают на воздухе и помещают в электронный микроскоп. Вирион вируса оспы коз имеет форму параллелепипеда, покрыт короткими цилиндрическими элементами, имеет размеры приблизительно 290 x 270 нм. Мембраны, полученные из клеток хозяина, могут окружать несколько вирионов, и для подтверждения внешнего вида следует исследовать их как можно больше (Kitching & Smale, 1986).

Вирионы каприпоксвируса неотличимы от вирионов ортопоксвируса, но, в отличие от вируса коровьей оспы ортопоксвирус не является причиной возникновения поражений у овец и коз. Однако каприпоксвирус отличается от вирионов парапоксвируса, которые являются причиной контактиозного пустулярного дерматита, поскольку они меньше по размеру, имеют овальную форму и покрыты трубчатыми структурами, которые придают вид бороздок на вирионе.

1.4. Гистопатология

Материал для гистопатологии готовят стандартными методами. После приготовления, окрашивания гематоксилином и эозином и заливки фиксированного в формалине биопсийного материала, ряд срезов исследуют методом световой микроскопии. При гистологическом исследовании наиболее яркие виды поражений кожи в острой стадии представляют собой массивный клеточный инфильтрат, васкулит и отек. Ранние поражения характеризуются меченой периваскулярной инфильтрацией. Исходная инфильтрация осуществляется макрофагами, нейтрофилами и иногда эозинофилами, и по мере развития поражений, большим количеством макрофагов, лимфоцитами и плазмócитами. Характерной чертой всех каприпоксвирусных инфекций является наличие изменяемого количества «клеток оспы овец» в слое дермы. Данные клетки оспы овец могут также появляться в других органах, где имеются микроскопические поражения оспы овец и коз. Данные клетки представляют собой крупные звездчатые клетки с эозинофильными, слабовыраженными внутрицитоплазмическими включениями и вакуолизированным ядром. Васкулит сопровождается тромбозом и инфарктом, вызывая отек и некроз. Эпидермальные изменения представляют собой акантоз, паракератоз и гиперкератоз. Изменения в других органах аналогичны с преобладанием клеточной инфильтрации и васкулита. Поражения верхних дыхательных путей характеризуются образованием язв.

1.5. Иммунологические методы

1.5.1. Реакции иммунофлуоресценции

Антиген к каприпоксвирусу можно также идентифицировать на инфицированных покровных стеклах или предметных стеклах для тканевых культур с использованием реакций иммунофлуоресценции. Покровные стекла или предметные стекла промывают, просушивают и фиксируют в холодном ацетоне в течение 10 минут. Непрямой тест с использованием иммунной овечьей или козьей сывороток подвергают воздействию фонового окрашивания высокой интенсивности и неспецифичных реакций. Однако прямой конъюгат может быть приготовлен из сывороток реконвалесцентных овец и коз или гипериммунизированных очищенным каприпоксвирусом кроликов. Неинфицированные тканевые культуры следует включать в качестве отрицательных контролей, поскольку перекрестные реакции, благодаря антителам к антигенам клеточных культур, могут вызывать проблемы. Метод иммунофлуоресценции на срезах тканевых культур может также быть использован на готовых криостатных препаратах.

1.6. Методы распознавания нуклеиновых кислот

Аmplификационные методы для выявления генома вирусной ДНК специфичны к роду *Sarpiroхvirus* и чувствительны для выявления на всем протяжении развития болезни, включая период до и после возникновения гуморальных иммунных реакций. Данные методы включают традиционную ПЦР, ПЦР в реальном времени и последнюю разработанную изотермическую амплификацию с формированием петель. Методы распознавания нуклеиновых кислот могут использоваться для выявления генома каприпоксвируса в биопсийных пробах, мазках или тканевых культурах.

1.6.1. Методы традиционной ПЦР

При проведении некоторых традиционных методов ПЦР сообщалось о различной степени специфичности для каприпоксвирусов в целом, вируса оспы овец или вируса оспы коз (Heine et al., 1999; Ireland & Vinopal, 1998; Zro et al., 2014a). Традиционные методы ПЦР, в частности, пригодны для получения достаточного количества генетического материала, необходимого для идентификации видов путем последовательного секвенирования и филогенетического анализа (Le Goff et al., 2009).

1.6.2. Методы ПЦР в реальном времени

Разработаны и валидированы несколько высокочувствительных и основанных на специфичности выявления флуоресценции методов ПЦР (Balinsky et al., 2008; Bowden et al., 2008; Das et al., 2012; Stubs et al., 2012). Все тесты позволяют выявлять небольшой консервативный генетический локус в геноме каприпоксвируса, но эти методы не дифференцируют вирус оспы овец, вирус оспы коз или вирус нодулярного дерматоза. Описаны методы ПЦР в реальном времени для прямого генотипирования каприпоксвируса без необходимости генетического секвенирования (Gelaye et al., 2013; Lamien et al., 2011).

1.6.3. Изотермическая амплификация генома

Сообщают, что молекулярные исследования с использованием изотермической амплификации с образованием петли (LAMP) для выявления геномов каприпоксвируса обеспечивают чувствительность и специфичность аналогично методу ПЦР в реальном времени, являясь при этом, более простыми и недорогими (Das et al., 2012; Murray et al., 2013). Сообщалось о полевой валидации LAMP метода Das et al., 2012 (Omoga et al., 2016) и о комбинировании данного универсального теста на выявление каприпоксвируса с двумя дополнительными LAMP методами с целью демонстрации их практичности для дифференцирования вирусов оспы овец и оспы коз (Zhao et al., 2014).

2. Серологические тесты

2.1. Реакция вируснейтрализации

Тест-сыворотку либо титруют постоянным титром каприпоксвируса (100 TCID₅₀ [50% инфекционная доза в тканевой культуре]) или стандартный штамм вируса титруют постоянным разведением тканевой культуры с целью подсчета индекса нейтрализации. В связи с разной чувствительностью тканевой культуры к каприпоксвирусу и последующей сложности обеспечить использование 100 TCID₅₀, определение индекса нейтрализации является предпочтительным методом, хотя он и требует большего объема тест-сыворотки. Данный тест проводят с использованием 96-луночных микротитрационных плоскодонных планшетов для тканевых культур, но его можно проводить также и в колбах для тканевых культур с внесением соответствующих изменений в используемые объемы, хотя более затруднительным представляется считывание конечной точки титрования в колбе. Сообщают о получении более достоверных результатов при использовании Vero клеток в реакции вируснейтрализации (Kitching & Taylor, 1985).

2.1.1 Ход процедуры

i) Тест-сыворотки, включая отрицательный и положительный контроль, разводят 1/5 в среде Игла/ NEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) и инактивируют при 56°C в течение 30 минут.

ii) Затем, 50 мкл первой инактивированной сыворотки добавляют в колонки 1 и 2, ряды А-Н микротитрационного планшета. Вторую сыворотку помещают в колонки 3 и 4, третью - в колонки 5 и 6, положительную контрольную сыворотку помещают в колонки 7 и 8, отрицательную контрольную сыворотку помещают в колонки 9 и 10, и 50 мкл среды Игла/ NEPES без сыворотки помещают в колонки 11 и 12 и во все лунки ряда Н.

iii) Референтный штамм каприпоксвируса, обычно вакцинный штамм, который хорошо развивается в тканевой культуре, с титром, превышающим log₁₀ 6 TCID₅₀ на мл разводят в среде Игла/ NEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) в мини-флаконах для получения логарифмических серий разведений log₁₀ 5.0; 4.0; 3.5; 3.0; 2.5; 2.0; 1.5 TCID₅₀ на мл (эквивалент log₁₀ 3.7; 2.7; 2.2; 1.7; 1.2; 0.7; 0.2 TCID₅₀ на 50 мкл).

iv) Начиная с ряда G и наиболее разведенного вирусного препарата, 50 мкл вируса добавляют в каждую лунку в данном ряду. Повторяют с каждым разведением вируса, наиболее высокий титр разведения вируса находится в ряду A.

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

vi) Клетки LT готовят из предварительно выращенных монослоев в качестве суспензии из 10^5 клеток/мл в среде Игла, содержащей антибиотики и 2% телячьей фетальной сыворотки. После инкубирования микротитрационных планшетов 100 мкл суспензии клеток добавляют во все лунки, за исключением лунок H11 и H12, которые служат в качестве контрольных лунок для среды. Оставшиеся лунки ряда H – контроли токсичности клеток и сывороток.

vii) Микротитрационные планшеты покрывают и инкубируют при 37°C в течение 9 дней.

viii) Монослои исследуют ежедневно через инверсионный микроскоп, начиная с 4 дня, на наличие ЦПД. В клетках ряда H ЦПД не должно наблюдаться. Используя вакцинный штамм 0240 KSGP каприпоксвируса, на 9 день считывают окончательное значение, а титр вируса в каждом повторном разведении рассчитывают по методу Карбера. Если оставить на более длительный период, происходит «прорыв» вируса, при котором первоначально инактивированный вирус высвобождается из антитела.

ix) *Интерпретация результатов:* Индекс нейтрализации - это логарифмическая разница титров между титром вируса в отрицательной сыворотке и в тест-сыворотке. Индекс, составляющий $\geq 1,5$, является положительным. Испытание можно сделать более чувствительным, если сыворотку от того же животного исследовать до и после заражения. Поскольку иммунитет к каприпоксвирусу является преимущественно клеточноопосредованным, отрицательный результат, в частности, после вакцинации, при которой реакция неизбежно слаба, не подразумевает, что животное, от которого была получена сыворотка, не является защищенным.

Реакция нейтрализации, при которой различные разведения вируса смешивают с неразведенной противовирусной сывороткой, описывали с использованием разведений сыворотки в диапазоне от 1/5 до 1/500 и фетальных клеток мышц телят. Благодаря низкой чувствительности данных клеток к каприпоксвирусу по сравнению с LT клетками, проблема «прорыва» вируса решена.

2.2. Реакция непрямой иммунофлуоресценции

Тканевые культуры, инфицированные каприпоксвирусом и выращенные на узких покровных стеклах или предметных стеклах микроскопа для тканевых культур, можно использовать для проведения реакции непрямой иммунофлуоресценции. В реакции используют неинфицированные контроли тканевых культур и положительные и отрицательные контрольные сыворотки. Инфицированные и контрольные культуры фиксируют в ацетоне при -20°C в течение 10 минут и хранят при 4°C. Разведения тест-сывороток проводят в ФБР, начиная с 1/5, а положительные идентифицируют с использованием анти-овечьего гамма-глобулина, конъюгированного флуоресцинизоцианатом (Davies & Otema, 1978). Могут наблюдаться перекрестные реакции с вирусом контагиозного пустулезного дерматита овец и коз, вирусом бычьего папулезного стоматита и, вероятно с другими поксвирусами.

2.3. Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг тест-сывороток к клеточному лизату, инфицированному каприпоксвирусом, обеспечивает чувствительную и специфичную систему для выявления антител к структурным белкам каприпоксвируса, хотя тест дорогостоящ и затруднителен для проведения (Chand et al., 1994).

2.4. Твердофазный иммуно-ферментный анализ

Валидированный ИФА для серологической диагностики оспы овец или оспы коз отсутствует.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общие сведения

1.1. Научное обоснование и назначение препарата

Для обеспечения защиты от оспы овец и оспы коз используют разнообразные аттенуированные живые и инактивированные вакцины против каприпоксвируса. Все штаммы каприпоксвируса овец, коз или КРС, исследованные на настоящее время, имеют главный нейтрализующий сайт, так что животные, перенесшие заражение одним штаммом становятся резистентными к заражению другими штаммами (Capstick, 1961). Таким образом, существует возможность использовать отдельный штамм каприпоксвируса для защиты как овец, так и коз от всех полевых штаммов вируса, независимо от того, имеют ли они азиатское или африканское происхождение (Kitching et al., 1986; Kitching & Taylor, 1985). Однако данные полевых испытаний предполагают, что некоторые штаммы являются довольно специфичными по отношению к хозяину и используются только у овец против вируса оспы овец и только у коз против вируса оспы коз.

Ряд штаммов каприпоксвируса имеет широкое применение в качестве живых вакцин (Davies & Mbugwa, 1985), например, Румынский и RM-65 штаммы, используемые, главным образом, для овец, и штаммы Mysore и Gorgan, используемые для коз. Недавно было подтверждено, что очевидная идентичность традиционно используемого кенийского штамма 0240 вакцинного вируса оспы овец и оспы коз (KSGP) фактически является LSDV (Turpurainen et al., 2014). Следует оценивать и учитывать идентичность и аттенуированность штамма вируса при выборе штаммов вакцин для использования у КРС, овец и коз. Защитная доза зависит от используемого вакцинного штамма. Иммунитет у овец и коз к каприпоксвирусу после вакцинации штаммом 0240 длится более года, а румынский штамм обеспечивает защиту не менее 30 месяцев.

Инактивированные вакцины, получаемые из тканевой культуры, содержат только зрелый внутриклеточный вирион вируса и не имеют менее шероховатой, но биологически важной внутриклеточной формы оболочечного вириона. В результате, вакцина не стимулирует иммунитет против внеклеточного оболочечного вириона, вследствие слабой защиты. Инактивированная противокаприпоксвирусная вакцина обеспечивает, в лучшем случае, лишь временную защиту.

2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

Общие требования, установленные для предприятий, производящих вакцины, и для хранения документации и записей в течение всего производственного процесса описаны в Главе 1.1.8 Принципы производства ветеринарных вакцин. Документация должна содержать стандартные операционные процедуры (СОП) для метода производства и всех стадий тестирования клеток и реактивов, используемых в процессе, всех партий и готовой продукции.

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Штамм каприпоксвируса, используемый для производства вакцин, должен сопровождаться описанием с указанием его происхождения и пассирования на тканевой культуре или на животных. Он должен быть безопасен для использования на всех породах овец или коз, для которых он предназначен, включая беременных животных и молодняк. Он должен быть нетрансмиссивным, оставаться аттенуированным после дополнительного

пассирования на тканевой культуре и обеспечивать полную защиту против контрольного заражения вирулентными полевыми штаммами в течение не менее 1 года. Определенное количество исходного посевного вакцинного вируса готовят и хранят с целью обеспечения наличия соответствующего рабочего посевного вируса для отлаженного производства вакцин.

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

Весь посевной материал подлежит тестированию с целью обеспечения его идентичности и подтверждения отсутствия занесенных вирусов, в частности, пестивирусов, таких как вирусы пограничной болезни овец и вирусной диареи КРС, а также отсутствия контаминации бактериями, грибами и/или микоплазмой. Общие процедуры проведения анализов на стерильность или чистоту описаны в главе 1.1.9. Посевной вирус также должен быть безопасен и не должен вызывать никаких клинических реакций у всех пород овец или коз при ведении рекомендованным способом, а также должен стимулировать абсолютный иммунитет к каприпоксвирусу у всех пород овец и коз в течение минимум 1 года. В Разделе С.2.2.4 Тестирование партий готового продукта описаны исследования на безопасность и испытания на иммуногенность.

2.2. Метод производства

Метод производства подлежит документированию как указано в Кратком описании производства.

2.2.1 Процедура

Вакцинный посевной материал лиофилизируют и хранят в 2мл пробирках при -20°C . Его можно хранить во влажном состоянии при -20°C , однако, будучи влажным, он более стабилен при температурах -70°C или ниже. Вирус культивируют на первичных или вторичных LT или LK клетках шерстных пород овец для получения максимального урожая вируса. Vero клетки можно также использовать с соответствующими адаптивными штаммами.

Партии вакцин продуцируют на свежеприготовленных монослоях вторичных LT или первичных LK клеток. Пробирку с посевным вирусом ресуспендируют в среде GMEM или в другой пригодной среде и инокулируют на LT или LK монослой, предварительно промытый теплым ФБР, выдерживают для абсорбции в течение 15 минут при 37°C до нанесения дополнительной среды GMEM. Через 4-6 дней наблюдается экстенсивное (80–90%) ЦПД. Культуру исследуют на наличие неспецифического ЦПД, помутнение среды или изменение pH. Культуру подвергают трехкратному замораживанию-оттаиванию, суспензию удаляют и центрифугируют при 600g в течение 20 минут. Для продуцирования достаточного количества вируса, для производственной партии может потребоваться второй пассаж. Живую вакцину можно продуцировать в роллер-флаконах.

Процедуру повторяют, урожай, полученный из отдельных пронумерованных флаконов, смешивают отдельно с равным объемом стерильного и охлажденного 5% лактальбумина гидролизата и 10% сахарозой и переносят в отдельно пронумерованные флаконы для хранения при -20°C . Перед хранением 0,2 мл удаляют из каждого флакона для проверки стерильности. Дополнительно 0,2 мл удаляют для проведения титрования вируса; используют 2 мл пула, состоящего из 0,2 мл образца, взятого из 10 флаконов. Записи обо всех процедурах хранят для всех партий вакцин.

Инактивированные вакцины продуцируют, обычно из неаттенуированных полевых штаммов каприпоксвируса, выращенного на тканевой культуре как описано выше,

инактивируют 0,03% формальдегидом, смешивают с равным объемом гидроокиси алюминия в качестве адьюванта. Формальдегид более не считается пригодным инактивирующим веществом для некоторых вирусных вакцин в связи с тем, что механизм действия не гарантирует абсолютной эффективности при инаktivации всех вирусных вакцин. Этот механизм еще не был полностью изучен в отношении каприпоксвирусов.

2.2.2. Требования к субстрату и среде

Следует документировать технические условия производства и источники всех компонентов, используемых в технологическом процессе, а также проводить исследование на отсутствие посторонних веществ: бактерий, грибов, микоплазмы и иных вирусов. Подробная процедура тестирования приведена в Главе 1.1.9. Применять антибиотики следует в соответствии с требованиями лицензирующего органа.

2.2.3. Технологический контроль

i) Клетки

Клетки получают из семенников или почек здоровых молодых барашков шерстной породы из стада, свободного от заражения скрепи. В процессе культивирования клетки исследуют на наличие признаков ЦПД и нормальную морфологию (преимущественно фибробластов). Как правило, возможно пассирование клеток до десяти раз. При использовании для производства вакцин незараженные контрольные культуры выращивают параллельно и используют как минимум в трех дополнительных пассажах для дальнейшего изучения. Их проверяют на наличие нецитопатических штаммов бычьей вирусной диареи или вирусов пограничной болезни овец иммунофлуоресцентным или иммунопероксидазным методом. По возможности, клетки готовят и скринируют перед производством вакцин и хранят в жидком азоте 1-2 мл аликвоты, содержащие 2×10^7 клеток/мл в стерильном растворе 10% DMSO (диметил сульфид) и 90% ФБС (фетальная бычья сыворотка).

ii) Сыворотка

Бычья сыворотка, используемая в питательной или поддерживающей среде, должна быть свободна от трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ) и антител к каприпоксвирусу и проверена на отсутствие контаминации пестивирусом или иными вирусами, чужеродными бактериями, микоплазмой или грибами.

iii) Среда

Среда подлежит проверке на отсутствие контаминации пестивирусом или иными вирусами, чужеродными бактериями, микоплазмой или грибами.

iv) Вирус

Посевной вирус и готовую вакцину титруют в пробирках для тканевых культур или микротитрационных планшетах. Образцы вакцины исследуют на наличие занесенных вирусов, включая цитопатические и нецитопатические штаммы пестивирусов, и смешивают с высокотитрованной иммунной сывороткой к каприпоксвирусу, которая дала отрицательную реакцию на антитела к пестивирусу, во избежание искажения результатов из-за присутствия интерферирующего вакцинного вируса. Активное вещество вакцины хранят при -20°C или ниже до завершения всех анализов на стерильность и титрований, после чего его лиофилизируют в 1 мл аликвотах в пробирках, рассчитанных на 100 доз. Урожай вакцины, разведенный гидролизатом лактальбумина и сахарозой, должен иметь минимальный титр $\log_{10} 4.5 \text{ TCID}_{50}$ на мл после лиофилизации, эквивалентный полевой дозе $\log_{10} 2.5 \text{ TCID}_{50}$. Последующее титрование проводят на пяти произвольно выбранных пробирках лиофилизованного препарата для подтверждения титра.

2.2.4. Тестирование партии готового продукта

i) Стерильность/чистота

Процедура испытания биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования, на стерильность и свободу от контаминации описана в Главе 1.1.9.

ii) Безопасность

Результаты исследований на безопасность следует подтверждать статистически достоверными результатами вакцинации сероотрицательных молодых овец и коз с известной предрасположенностью к каприпоксвирусу. Описываемая процедура является подходящей для вакцинных штаммов, таких как 0240, которые являются в равной степени иммуногенными как у овец, так и у коз. Выбор целевого животного осуществляют с учетом штаммов с более ограниченной специфичностью возбудителя в отношении выбора хозяина.

iii) Иммуногенность

Испытание вакцины на иммуногенность проводят в случае, если минимальная иммунизирующая доза штамма вируса неизвестна. Обычно испытание проводят путем сравнения титра вводимого вирулентного вируса на участках паховой области вакцинированных и контрольных животных. После вакцинации сбривают шерсть на участках паховой области как минимум трех животных и трех контролей. \log_{10} разведения вируса для контрольного заражения готовят в стерильном ФБР, шесть разведений вводят внутривожно (0,1 мл на инокулят) по длине участка паховой области; четыре репликата каждого разведения вводят вглубь участка паховой области. В месте инъекции на всех 24 участках у контрольных животных могут появляться отеки, однако, на четырех участках введения наиболее разведенных инокулятов желательна наличие слабой реакции или ее полное отсутствие. В течение 24 часов у вакцинированных животных на участках введения должна наблюдаться реакция гиперчувствительности, которая должна быстро исчезнуть. В местах введения наиболее концентрированного вируса могут образовываться небольшие некротические участки. Макулу/папулу измеряют в период с 8 по 10 день после контрольного заражения. Титр вводимого вируса рассчитывают для вакцинированных и контрольных животных; разницу титра $\log_{10} > 2.5$ считают подтверждением защиты.

2.3. Требования к регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Вакцина должна быть безопасной для всех пород овец и коз, для которых она предназначена, включая молодых и беременных животных. Она также должна быть нетрансмиссивной, оставаться аттенуированной после дополнительного пассирования на тканевой культуре.

Следует проводить исследования на безопасность готового продукта каждой партии, как описано в Разделе С.2.2.4. Безопасность вакцины для использования на нецелевых видах животных подтверждают на мышах и морских свинках, как описано Разделе С.2.2.4. Применение вакцины не должно вызывать патологий.

ii) Реверсия вирулентности для живых/аттенуированных вакцин

Отобранная готовая вакцина не должна восстанавливать вирулентность во время дополнительных пассажей у целевых животных.

iii) Экологические факторы

Аттенуированная вакцина не должна иметь возможность закрепиться в популяциях крупного рогатого скота, овец или коз. Не следует использовать вакцины на штамме 0240 у пород диких быков. Штаммы каприпоксвируса не опасны для здоровья человека. Меры предосторожности, за исключением вышеописанных в отношении стерильности и свободы от занесенных возбудителей, отсутствуют.

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

Эффективность вакцины доказывают в ходе экспериментов по контрольному заражению после вакцинации, проводимых в лабораторных условиях, как описано в Разделе С.2.2.4. После определения иммуногенности необходимой для обеспечения иммунитета минимальной дозы определенного штамма, использованного для производства вакцины, необходимость повторять проверку на готовом продукте каждой партии, при условии, что титр вводимого вируса был установлен, отсутствует.

ii) Для контроля и искоренения

Единственным эффективным способом борьбы со вспышками оспы овец и оспы коз в эндемичных регионах является вакцинация. К сожалению, в настоящее время не существует маркерных вакцин, позволяющих дифференцировать зараженных животных от вакцинированных.

Иммунитет к вирулентному полевому вирусу после вакцинации овец и коз штаммом 0240 сохраняется в течение 1 года, а защита от генерализованной инфекции после внутрикожного введения сохраняется не менее 3 лет и является эффективной в течение жизни. Продолжительность иммунитета, выработанного другими вакцинными штаммами, следует определять и у овец и у коз путем проведения контролируемых исследований в условиях, обеспечивающих отсутствие влияния полевых штаммов каприпоксвируса на результаты. Инактивированные вакцины обеспечивают иммунитет на период до 1 года, и по причинам, указанным в начале данного раздела, не обеспечивают иммунитет к форме каприпоксвируса, обычно ассоциированного с передачей естественным путем.

2.3.3. Стабильность

Срок годности всех вакцин изначально составляет 24 месяца. Затем проводят исследования стабильности в реальном времени для подтверждения соответствия срока годности. Многочисленные партии вакцин подлежат регулярному повторному титрованию в течение срока годности с целью определения вариабельности вакцин.

Должным образом лиофилизированные препараты противокаприпоксвирусной вакцины, в частности, те, которые включают протектор, такой как сахароза и гидролизат лактальбумина, стабильны более 25 лет при условии хранения при -20°C и в течение 2-4 лет при хранении при 4°C . Имеются подтверждения, что они стабильны при более высоких температурах, однако сообщения о долгосрочных контролируемых экспериментах отсутствуют. Инактивированные вакцины следует хранить при 4°C , а их срок годности обычно составляет 1 год.

Для лиофилизированного препарата не требуются стабилизаторы, помимо протектора, такого как сахароза и гидролизат лактальбумина.

3. Вакцины на основе биотехнологий

3.1. Имеющиеся вакцины и их преимущества

В настоящее время рекомбинантные вакцины против каприпоксвируса на рынке отсутствуют. Однако разрабатывается новое поколение противокаприпоксвирусных вакцин, в которых геном каприпоксвируса используется в качестве вектора для генов других патогенов жвачных животных, таких как вирус чумы мелких жвачных (PPR) (Berhe et al., 2003; Turpurainen et al., 2014).

3.2. Особые требования к биотехнологическим вакцинам, при наличии

Не применяются.

СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- BALINSKY C.A, DELHON G, SMOLIGA G, PRARAT M, FRENCH R.A, GEARY S.J, ROCK D.L & RODRIGUEZ L.L. (2008). Rapid preclinical detection of sheep pox virus by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 438–442.
- 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-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol.*, 77, 1571–1577.
- BOWDEN T.R, BABIUK S.L, PARKYN G.R., COPPS J.S. & BOYLE D.B. (2008). Capripox virus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371, 380–393.
- CAPSTICK P.B. (1961). Annual Report. Kenya Veterinary Department, Kenya, 45–47.
- CHAND P., KITCHING R.P. & BLACK D.N. (1994). Western blot analysis of virus-specific antibody responses to capripoxvirus and contagious pustular dermatitis infections in sheep. *Epidemiol. Infect.*, 113, 377–385.
- DAS A., BABIUK S. & MCINTOSH M.T. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 1613–1620.
- DAVIES F.G. & MBUGWA G. (1985). The alterations in pathogenicity and immunogenicity of a Kenya sheep and goat pox virus on serial passage in bovine foetal muscle cell cultures. *J. Comp. Pathol.*, 95, 565–576.
- DAVIES F.G. & OTEMA C. (1978). The antibody response in sheep infected with a Kenyan sheep and goat pox virus. *J. Comp. Pathol.*, 88, 205–210.
- GELAYE E., LAMIEN C.E., SILBER R., TUPPURAINEN E.S., GRABHERR R. & DIALLO A. (2013). Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PLoS One*, 8 (10): e75971.
- HEINE H.G., STEVENS M.P., FOORD A.J. & BOYLE D.B. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *J. Immunol. Methods*, 227, 187–196.
- IRELAND D.C. & BINEPAL Y.S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods*, 74, 1–7.
- KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & TAYLOR W.P. (1986). A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Res. Vet. Sci.*, 42, 53–60.
- KITCHING R.P. & SMALE C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, 41, 425–427.
- KITCHING R.P. & TAYLOR W.P. (1985). Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Trop. Anim. Health Prod.*, 17, 64–74.
- LAMIEN C.E., LELENTA M., GOGER W., SILBER R., TUPPURAINEN E., MATIJEVIC M., LUCKINS A.G. & DIALLO A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *J. Virol. Methods*, 171, 134–140.
- LE GOFF C., LAMIEN C.E., FAKHF AFH E., CHADEYRAS A., ABU-ADULUGBAD E., LIBEAU G., TUPPURAINEN E., WALLACE D., ADAM T., SILBER R., GULYAZ V., MADANI H., CAUFOUR P., HAMAMMI S., DIALLO A. & ALBINA E. (2009). Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor, a host-range gene suitable for virus-animal origin discrimination. *J. Gen. Virol.*, 90, 67–77.

MURRAY L., EDWARDS L., TUPPURAINEN E.S., BACHANEK-BANKOWSKA K., OURA C.A., MIOULET V. & KING D.P. (2013). Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Vet. Res.*, 9, 90.

OMOGA D.C.A., MACHARIA M., MAGIRI E., KINYUA J., KASIITI J. & HOLTON T. (2016) Molecular based detection, validation of a LAMP assay and phylogenetic analysis of capripoxvirus in Kenya. *J. Adv. Biol. Biotech.*, 7, 1–12.

STUBBS S., OURA C.A., HENSTOCKA M., BOWDEN T.R., KING D.P. & TUPPURAINEN E.S. (2012). Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. *J. Virol. Methods*, 179, 419–422.

TUPPURAINEN E.S.M., PEARSON C.R., BACHANEK-BANKOWSKA K., KNOWLES N.J., AMAREEN S., FROST L., HENSTOCK M.R., LAMIEN C.E., DIALLO A. & MERTENS P.P.C. (2014). Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. *Antiviral Res.*, 109, 1–6.

ZHAO Z., FAN B., WU G., YAN X., LI Y., ZHOU X., YUE H., DAI X., ZHU H., TIAN B., LI J. & ZHANG Q. (2014) Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat Pox virus and Sheep Pox virus. *BMC Microbiol.*, 14, 1–10.

ZRO K., AZELMAT S., BENDOURO Y., KUHN J.H., EL FAHIME E. & ENNAJI M.M. (2014a). PCR-based assay to detect sheeppox virus in ocular, nasal, and rectal swabs from infected Moroccan sheep. *J. Virol. Methods*, 204, 38–43.

ZRO K., ZAKHAM F., MELLOUL M., EL FAHIME E. & MUSTAPHA M. (2014b). A sheeppox outbreak in Morocco: isolation and identification of virus responsible for the new clinical form of disease. *BMC Vet Res.*, 10, 31.

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по оспе овец и оспе коз (смотри таблицу в Части 4 данного Руководства по наземным животным или обратитесь к веб-сайту МЭБ за самым последним списком: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Для получения дальнейшей информации по диагностическим тестам и реактивам в отношении оспы овец и оспы коз следует обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.