

## ИНФЕКЦИОННАЯ ПЛЕВРОПНЕВМОНИЯ КОЗ

### РЕЗЮМЕ

**Определение болезни.** Инфекционная плеввропневмония коз (ИППК) – заболевание, поражающее коз и некоторые виды диких жвачных животных. Возбудителем является *Mycoplasma capricolum* подвида *capripneumoniae* (Мсср). У коз болезнь проявляется в виде анорексии, лихорадки и респираторных признаков, таких, как одышка, учащенное дыхание, кашель и выделения из носа. Острая и подострая формы заболевания характеризуются односторонней серофибринозной пневмонией с тяжелым экссудативным плевритом. Постановка диагноза осуществляется на основе клинических наблюдений и результатов вскрытия; диагноз должен подтверждаться результатами лабораторных исследований. Поскольку изоляция Мсср представляет сложность, для лабораторного подтверждения диагноза следует использовать молекулярные методы.

**Идентификация возбудителя.** У живых животных берут образцы бронхоальвеолярного смыва или плевральной жидкости, получаемых посредством пункции. При вскрытии берут образцы пораженных легких, лимфатических узлов и плевральной жидкости. Для культивирования патогена ткани измельчают в буферном растворе и помещают в селективные бульонные и твердые среды с добавлением антибиотиков или иных ингибиторов, предотвращающих развитие других видов бактерий. Для роста Мсср требуется обогащенная среда, содержащая высокий процент сыворотки. Изоляцию затрудняет крайне медленный рост Мсср, занимающий до 15 дней, и присутствие других видов микоплазм, например *M. ovipneumoniae*.

В бульонных средах рост становится визуально заметным по прошествии 4-15 дней, но помутнение всегда очень слабо выражено. При отсутствии встряхивания в жидких культурах Мсср иногда образует «кометы». На агаровых средах типичные колонии в виде «яичницы-глазуньи» всегда имеют очень маленький размер (0,1–0,5 мм) и отличаются от колоний, формируемых *M. Ovipneumoniae*, которые не имеют центра. Для быстрой и специфической идентификации Мсср могут применяться молекулярные методы.

**Серологические исследования.** Для целей диагностики может использоваться реакция связывания комплемента (РСК). Козы часто заражаются другими видами микоплазм, близкородственными Мсср, что обуславливает наличие перекрестных реакций при проведении РСК. Разработаны альтернативные тесты, например, реакция латексной агглютинации и конкурентный иммуноферментный анализ.

**Требования к вакцинам.** Для борьбы с ИППК используют инактивированные и адъювантные вакцины. Антиген состоит из целых клеток Мсср, концентрированных и частично очищенных. Минимальное содержание протеина Мсср составляет 0,15 мг на одну дозу. В качестве адъюванта выбирают сапонин, количество которого в каждой дозе примерно равно 3 мг. Количество адъюванта может варьировать в зависимости от партии сапонины.

### А. ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная плеввропневмония коз (ИППК) является тяжелым заболеванием коз, распространенным во многих странах Африки и Азии. Возбудитель ИППК - *Mycoplasma capricolum*, подвида *capripneumoniae* (Мсср). Острая форма заболевания характеризуется односторонней серофибринозной пневмонией с тяжелым экссудативным плевритом (Thiaucourt & Bolske, 1996). Синонимичные названия ИППК: контактная плеввропневмония коз, бу-фрида (Алжир) и абу-нини (Судан).

С таксономической точки зрения Мсср принадлежит к так называемому «кластеру *mycoides*» (Manso-Silvan *et al.*, 2007) и лишь недавно получила свое название (Leach *et al.*, 1993). Ближайшими родственниками Мсср являются *Mycoplasma capricolum*, подвида *capricolum*, и *Mycoplasma leachii*, которые могут давать перекрестную реакцию с Мсср. Однако другие члены кластера *mycoides*, например, *Mycoplasma mycoides*, подвида *capri* или *Mycoplasma mycoides*, подвида *mycoides* также могут демонстрировать определенное сходство с Мсср. *Mycoplasma capricolum* подвида *capripneumoniae* (Мсср) отличается прихотливостью, и легкое помутнение в жидких средах или колонии на твердых средах появляются только по прошествии 5-15 дней. Попытки изоляции часто бывают неудачны, обнаружение микроорганизма легче осуществлять при помощи специфических молекулярных методов, например, ПЦР (Woubit *et al.*, 2004).

Впервые данное заболевание было описано в 1873 году в Алжире. Вскоре после этого, в 1881 году, болезнь была завезена в Южную Африку вместе с козами ангорской породы, поставленными в эту страну. Заболевание было искоренено путем применения политики забоя инфицированных животных в сочетании с традиционной процедурой вакцинации контактирующих животных (Hutcheon, 1889). *Mycoplasma capricolum* подвида *capripneumoniae* (*Mccp*) была впервые выделена в Кении и тогда же была подтверждена ее роль в качестве возбудителя ИППК (MacMartin *et al.*, 1980; MacOwan & Minette, 1976). Впоследствии изоляция данного микроорганизма была осуществлена в Чаде, Эритрее, Эфиопии, Нигере, Омане, Судане, Танзании, Тунисе, Турции, Уганде и ОАЭ, а также относительно недавно на Маврикии (Srivastava *et al.*, 2010), в Китае (КНР) (Chu *et al.*, 2011) и в Таджикистане (Amirbekov *et al.*, 2010). Первое сообщение об обнаружении ИППК на территории материковой Европы появилось в 2004 году, когда были подтверждены вспышки болезни во Фракийском регионе Турции, причем потери в некоторых стадах составили до 25% козлят и взрослых животных (Ozdemir *et al.*, 2005). Однако точные границы распространения заболевания неизвестны; они могут оказаться гораздо шире, чем территории, представленная странами, в которых была выделена *Mccp*, поскольку ИППК часто ошибочно принимают за другие респираторные заболевания, а также вследствие сложности изоляции возбудителя заболевания.

Во время вспышек ИППК в смешанных стадах коз и овец овцы также могут быть инфицированы, что подтверждено изоляцией *Mccp* (Bölske *et al.*, 1995) или обнаружением антител к *Mccp* у овец с клиническими признаками болезни. Кроме того, *Mccp* была выделена из материала здоровых овец (Litami *et al.*, 1990), и необходимо учитывать роль овец как резервуара данного заболевания.

Недавно наличие ИППК было подтверждено у диких жвачных животных, обитающих на территории природоохранного заповедника в Катаре. Заболевание отмечалось у следующих видов: безоаровый козел (*Capra aegagrus*), нубийский горный козел (*Capra ibex nubiana*), ларистанский муфлон (*Ovis orientalis laristanica*) и геренук (*Litocranius walleri*), и характеризовалось высоким уровнем заболеваемости и смертности среди указанных видов (Arif *et al.*, 2005). Также сообщалось о случаях заболевания среди газелей в Объединенных Арабских Эмиратах (Nicholas *et al.*, 2008).

ИППК не является зоонотической инфекцией. О случаях инфицирования людей бактерией – возбудителем ИППК не сообщалось. Меры по обеспечению биобезопасности определяются по итогам анализа рисков в соответствии с положениями Главы 1.1.4 «Биобезопасность и биозащита: стандарт контроля биологической опасности в ветеринарной лаборатории и вивариях». В странах, свободных от ИППК, любые манипуляции с *Mccp* следует проводить в лабораториях в условиях, соответствующих 2 уровню биобезопасности (BSL2) или выше.

Дифференциальная диагностика в полевых условиях может вызывать затруднения, поскольку козы подвержены инфицированию различными видами микоплазм, вызывающих сходную клиническую симптоматику. Однако подозрения на ИППК могут возникать в случаях локализации поражений в респираторном тракте, поражении только одного легкого и наличии у животных выраженного плеврита с обильным выделением плевральной жидкости. ИППК необходимо дифференцировать также с чумой мелких жвачных животных или пастереллезом.

## В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Диагностика вспышек респираторных заболеваний у коз, в частности, ИППК, представляет затруднения, особенно в случаях, когда они носят энзоотический характер. Необходимо дифференцировать ИППК и другие аналогичные клинико-патологические синдромы, включая чуму мелких жвачных животных, к которой восприимчивы также и овцы; пастереллез, который можно дифференцировать по характеру распределения макроскопических поражений в легких; и контагиозную агалактию (Nicholas & Churchward, 2011; Thiaucourt & Bolske, 1996). Заболевание, вызываемое *Mccp*, легко передается и смертельно опасно для восприимчивых к нему коз любого пола и возраста, но редко поражает овец и не представляет опасности для крупного рогатого скота.

Таблица 1. Лабораторные методы, в настоящее время используемые для диагностики ИППК, и их назначение

Метод	Назначение					
	Отсутствие вируса в популяции	Отсутствие вируса у отдельного животного перед перемещением	Роль в программах борьбы с заболеванием	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции (эпиднадзор)	Иммунный статус отдельного животного или популяции (после вакцинации)
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>						
Культивирование <i>in-vitro</i> <sup>2</sup>	–	–	–	++	–	–
Молекулярный анализ (ПЦР)	–	–	–	+++	–	–

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

2 Выделенные микроорганизмы подвергают подтверждающему анализу молекулярными, биохимическими или иммунологическими методами, как описано ниже.

Метод	Назначение					
	Отсутствие вируса в популяции	Отсутствие вируса у отдельного животного перед перемещением	Роль в программах борьбы с заболеванием	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции (эпиднадзор)	Иммунный статус отдельного животного или популяции (после вакцинации)
<b>Выявление иммунного ответа</b>						
<b>РСК</b>	++	++	–	++	++	+
<b>Агглютинация латекса</b>	+	+	–	+++	+	–
<b>К-ИФА</b>	+++	++	–	++	+++	+++

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

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

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РСК = реакция связывания комплемента; к-ИФА = конкурентный иммуноферментный анализ.

## 1. Идентификация возбудителя

### 1.1. Микроскопия легочных экссудатов, мазков-отпечатков или срезов

С гистологической точки зрения инфекция, вызываемая *Mscrr*, характеризуется интерстициальной пневмонией с интерстициальным, внутридольевым отеком легких (Kaliner & MacOwan, 1976). В условиях *in vivo* *Mscrr* формирует ветвящуюся, нитевидную структуру, которую можно наблюдать при изучении экссудатов или суспензий тканей, полученных из материала поражений или плевральной жидкости, методом микроскопии в темном поле. В качестве альтернативного метода, мазки из иссеченных поражений легких окрашивают по Маю-Грюнвальду-Гимзе и изучают под световым микроскопом. Другие виды микоплазм, поражающие коз, имеют вид коротких нитей или коккобацилл. Ни одна из указанных методик не может служить основанием для постановки точного диагноза.

### 1.2. Молекулярная идентификация и типирование: полимеразная цепная реакция

Опубликованы два протокола специфической идентификации *Mscrr*, в которых используется метод полимеразной цепной реакции. Первая методика (Bascunana *et al.*, 1994) основана на амплификации гена 16S рРНК кластера *mycooides*. Продукт ПЦР затем подвергают рестрикционному анализу с целью обнаружения ампликона *Mscrr*. Вторая методика (Woubit *et al.*, 2004) основана на специфической амплификации. Праймеры (*Mscrr*-специфичный-прямой/обратный) указаны ниже.

*Mscrr*-специфичный прямой: 5'-ATC-ATT-TTT-AAT-CCC-TTC-AAG-3'

*Mscrr*-специфичный обратный: 5'-TAC-TAT-GAG-TAA-TTA-TAA-TAT-ATG-CAA-3'

Порядок проведения ПЦР включает начальную стадию денатурации (2 минуты при 94°C), за которой следуют 35 циклов по 30 секунд при 94°C, 15 секунд при 47°C и 15 секунд при 72°C, и заключительная стадия удлинения (5 минут при 72°C). Длина ожидаемого амплифицированного продукта составляет 316 п.о.

Те же самые праймеры могут использоваться в ходе количественного анализа методом ПЦР (Lorenzon *et al.*, 2008).

Указанные методики на основе ПЦР могут использоваться непосредственно на клиническом материале, например, легочной ткани или плевральной жидкости (Bölske *et al.*, 1996), включая высушенную плевральную жидкость на фильтровальной бумаге. Вследствие сложности изоляции *Mscrr*, ПЦР является приоритетным методом для целей диагностики ИППК. Однако изоляция *Mscrr* по-прежнему остается подтверждающим тестом. Мультилокусное секвенирование-типирование позволяет установить для всех видов микоплазм, относящихся к кластеру *mycooides*, их точное филогенетическое положение (Manso-Silvan *et al.*, 2007).

### 1.3. Реакция преципитации в геле для обнаружения антигена в образцах тканей

*Mscrr* высвобождает антигенный полисахарид, к которому образуется специфическое моноклональное антитело (Rurangirwa *et al.*, 1987c). Это моноклональное антитело (MAb) формирует в агаровом геле иммунопреципитат с полисахаридом, вырабатываемым *Mscrr*, и используется для обнаружения возбудителя ИППК, в частности, когда образцы не подходят для культивирования из-за разложения, начавшегося в ходе транспортировки. MAb может быть заменено сывороткой коз, находящихся в фазе выздоровления после ИППК, при условии, что сыворотка образует преципитаты (то есть, содержит IgM). Данная реакция преципитации не всегда отличается абсолютной специфичностью и может давать некоторые перекрестные реакции, в особенности, с *M. leachii*.

## 1.4. Изоляция микоплазмы

### 1.4.1. Выбор образцов

При вскрытии предпочтительно получать образцы поражений легких (в частности, из области, расположенной на границе между рыхлой и уплотненной зонами), плевральной жидкости и средостенных лимфатических узлов. Если микробиологическое исследование не может быть проведено немедленно, образцы или легкие целиком могут храниться при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение длительного срока (несколько месяцев) с незначительной потерей жизнеспособности микоплазмы. Во время транспортировки образцы следует постоянно держать охлажденными, поскольку жизнеспособность микоплазмы стремительно падает с повышением температуры. Образцы легочной ткани могут доставляться в другие лаборатории в замороженном виде.

### 1.4.2. Обработка образцов

Мазки суспендируют в 2–3 мл культуральной питательной среды. Образцы тканей измельчают ножницами, а затем энергично встряхивают, или растирают в среде в следующей пропорции: 1 грамм ткани на 9 мл среды. Ткани не следует размалывать. Суспензию обычно готовят с использованием среды для культивирования микоплазмы, но если присутствует необходимость проведения параллельного бактериологического исследования, можно использовать качественную бактериологическую среду, например, питательный бульон, чтобы суспензия была пригодна для проведения обоих исследований. Плевральную жидкость, суспензию тканей или мазок подвергают серийному разведению (как минимум, три последовательных десятикратных разведения до  $10^{-4}$ ) в выбранной среде для культивирования микоплазмы. Разведения наносятся также на твердую среду.

### 1.4.3. Среда для культивирования микоплазмы

Среда, использованная Макованом и Минеттом для культивирования *Mccp* (MacOwan & Minette, 1976), носит название VFG и включает бульон из козьей печени и козью сыворотку. Альтернативными подходящими средами являются WJ (Jones & Wood, 1988), модифицированная среда Хейфлика и модифицированная триптозная бульонная среда Ньюинга (Kibor & Waiyaki, 1986). Среда, обогащенная 0,2% (или до 0,8%) пируватом натрия, обеспечивают лучший результат как для целей первичного посева, так и для выработки антигена *Mccp* (Mohan *et al.*, 1990; Thiaucourt *et al.*, 1992).

#### i) Среда для культивирования возбудителя ИППК

А) Часть, стерилизованная в автоклаве ( $121^{\circ}\text{C}$  в течение 15 минут)

Бульон бакто-ППО (плевропневмонияподобные организмы) без кристаллического фиолетового (Difco), 21 грамм; деионизированная вода (700 мл).

Б) Часть, отфильтрованная через мембрану

200 мл лошадиной сыворотки (можно использовать также свиную или ослиную сыворотки в качестве альтернативы), инактивированной нагреванием при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут; свежий экстракт дрожжей (100 мл); 2 мл глюкозы (стерильный раствор 0,5 г/мл); и 8 мл пирувата натрия (стерильный раствор 0,5 г/мл).

Часть Б добавляют к части А с соблюдением стерильности. Можно добавить ампициллин (0,1 г/литр) и ацетат таллия (250 мг/литр) с целью предотвращения загрязнения в ходе первичного посева. Конечное значение pH среды должно составлять 7,4–7,6.

#### ii) Модифицированная среда для культивирования возбудителя ИППК

А) Часть, стерилизованная в автоклаве ( $121^{\circ}\text{C}$  в течение 15 минут)

Бульон бакто-ППО (плевропневмонияподобные организмы) с кристаллическим фиолетовым (17,5 г); вода, дистиллированная в стеклянном сосуде (650 мл).

Б) Часть, отфильтрованная через мембрану

250 мл лошадиной сыворотки (можно использовать также свиную или ослиную сыворотки в качестве альтернативы), инактивированной нагреванием при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут; свежий экстракт дрожжей (100 мл); 50% глюкоза (4 мл); 25% пируват натрия (8 мл); 5% ацетат таллия (4 мл); ампициллин (250 мг); 0,5% феноловый красный (4 мл). pH доводят до 7,8 с помощью гидроксида натрия или соляной кислоты. Часть Б добавляют к части А с соблюдением стерильности.

#### 1.4.4. Приготовление, хранение и контроль качества питательной среды

Определенные компоненты питательной среды, в частности, сыворотку, экстракт дрожжей и деионизированную воду, до добавления в среду для культивирования микоплазмы следует регулярно проверять на способность к стимуляции роста. Для подобных проверок используют кратковременное пассирование полевых изолятов.

Бульонные среды могут храниться в течение, по крайней мере, 6 месяцев при  $-25^{\circ}\text{C}$ , но пенициллин или его аналоги добавляют непосредственно перед использованием. Бульонные среды разливают во флаконы (1,8 мл или 2,7 мл) или в пробирки с закручивающейся крышкой (4,5 мл) и хранят до 3 недель при  $4^{\circ}\text{C}$ . Для приготовления твердых сред лучше использовать агарозу (0,9% [вес/объем]), нобль-агар (1,5% [вес/объем]), или очищенный агар (0,6% [вес/объем]). Слой питательной среды, заливаемый в чашку Петри на толщину 6-8 мм, должен быть как можно более свежим на момент использования. Хранить такие среды можно при  $4^{\circ}\text{C}$  не более двух недель. Все культуральные питательные среды должны проходить контроль качества и обеспечивать разрастание небольших инокулятов микроорганизмов, относящихся к подвидам рода *Mycoplasma*. Параллельно исследуемым образцам следует культивировать эталонный штамм для обеспечения корректной постановки теста.

#### 1.4.5. Культивирование

Культуры инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$ . Слои питательной среды лучше всего инкубировать во влажной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$ , 95% воздуха или  $\text{N}_2$ , или в стеклянных подсвечниках с источником влаги. Возможно также инкубирование культур в анаэробной среде.

Культуры в бульонных средах проверяют ежедневно на наличие признаков роста микоплазмы, а именно, изменения цвета и появления хлопьев. Сильное помутнение говорит о наличии бактериального загрязнения. Культуры, в которых наблюдается бактериальное загрязнение, перед пересевом следует пропустить через мембранный фильтр с отверстиями 0,45 мкм. Пересев культур, выращиваемых в бульонных средах, осуществляется путем введения свежей бульонной среды в размере одной десятой от прежнего объема или путем посева штрихом на агаровой среде с помощью инокуляционной петли.

Культуры, выращиваемые на слое питательной среды, проверяют каждые 1-3 дня, используя стереомикроскоп ( $\times 5$ –50-кратное увеличение) и источники падающего и проходящего света. При получении отрицательного результата в течение 15 дней исследование культуры прекращают. Пересев осуществляют переносом вырезанных агаровых блоков, несущих отдельные колонии, в агар (в который блоки вдавливают лицевой стороной вниз) или в бульонную среду. В качестве альтернативы, небольшую часть агара с одной колонией забирают пипеткой Пастера и помещают в свежую бульонную среду.

Клонирование и очистка изолятов осуществляется многократным переносом единичных колоний, представляющих каждый наблюдаемый морфологический тип. Морфология колоний варьирует в зависимости от используемой среды, вида микоплазмы, числа пассажей и возраста культуры.

В ранних пассажах многие виды микоплазм образуют колонии необычного вида, часто небольшого размера, неправильной формы и не имеющие центра. Этот эффект часто связан с использованием среды, лишь в малой степени пригодной для данной цели. При дальнейшем пассировании такие изоляты формируют типичные колонии в виде яичницы-глазуньи, за исключением *M. ovipneumoniae*, колонии которой остаются бесцентровыми. Колонии *M. mycoides* подвида *capri* могут достигать до 3 мм в диаметре.

Фильтрация бульонных культур через фильтр с ячейками 0,45 мкм до пересева содействует очистке за счет удаления клеточных агрегатов.

Культуры, которые, предположительно, являются L-формами бактерий, необходимо исследовать на предмет восстановления бактериальной формы. Для этого проводят от трех до пяти пассажей на твердой среде для культивирования микоплазмы без добавления антибиотиков и ацетата таллия.

Бульонные среды, использованные для первичного посева и не демонстрирующие признаков роста микоплазмы в течение 7 дней, подвергают слепому пересеву.

Бульонные культуры с каждым из образцов, включая один слепой пересев, наблюдают в течение, как минимум, 3 недель перед тем как прекратить исследование. Результаты титрования бульонных культур, если оно осуществляется полностью (до  $10^{-10}$ ), также анализируют через 3–4 недели и выражают в цветоизменяющих единицах на объем. Рост микроорганизмов на слоях питательных сред выражается в колониеобразующих единицах (КОЕ) на мл.

### 1.5. Идентификация микоплазмы

#### 1.5.1. Полимеразная цепная реакция

По окончании этапа культивирования микроорганизмов, методом ПЦР в течение 1 дня подтверждается наличие *Mscp*. См. раздел В.1.2 настоящей главы.

В последнее время ПЦР и секвенирование использовались для установления молекулярной эпидемиологии ИППК. Кроме того, применение метода мультилокусного секвенирования (MLSA) (Manso-Silvan *et al.*, 2011) позволило установить две главные линии, включающие пять групп репрезентативной совокупности штаммов *Mscpr*.

Идентификация штаммов *Mscpr* с помощью метода ПЦР (и секвенирования) на данный момент превосходит все другие методы благодаря высокой скорости анализа и надежности результатов. Однако полимеразные цепные реакции следует проводить с большой аккуратностью с целью предотвратить возможное загрязнение (см. Руководство 3.2 «Биотехнология в диагностике инфекционных заболеваний»).

### 1.5.2. Биохимические исследования

Перед идентификацией дикие штаммы трижды подвергаются пассированию и, желательнее, клонированию.

Биохимические тесты не позволяют однозначно идентифицировать изолят – в настоящее время это возможно только средствами генетического анализа.

Наиболее часто используются следующие тесты: расщепление глюкозы (*Mscpr*: положительный), гидролиз аргинина (*Mscpr*: отрицательный), образование «пленки и пятен» (*Mscpr*: отрицательный), аэробное и анаэробное восстановление хлорида тетразолия (*Mscpr*: +/++), активность фосфатазы (*Mscpr*: отрицательный), гидролиз сыворотки (*Mscpr*: отрицательный) и чувствительность к дигитонину (*Mscpr*: положительный).

### 1.5.3. Серологическая идентификация

Антигены микоплазмы, используемые для выработки гипериммунной сыворотки, часто загрязнены компонентами среды. Стимуляция антител этими загрязнителями может приводить к получению ложноположительных результатов серологической идентификации. Данная проблема устраняется путем абсорбции антисыворотки средой, используемой для выработки антигена (10 мг лиофилизированной среды на мл антисыворотки), или путем выращивания микоплазм, используемых в качестве антигенов, в среде, содержащей гомологичные животные компоненты, например, выращивание в среде VFG для вакцинации коз.

#### и) Реакция подавления роста

Реакция подавления роста (РПР) представляет собой самый простой и наиболее специфичный из имеющихся тестов. Механизм состоит в прямом ингибировании роста специфической гипериммунной сывороткой на твердой среде. Тест позволяет обнаружить, преимущественно, поверхностные антигены.

*Mscpr*, по-видимому, отличается высокой серологической гомогенностью, и при применении сыворотки, содержащей антитела к типовому штамму, вне зависимости от источника исследуемого штамма, наблюдаются широкие зоны ингибирования, свободные от колоний «прорыва» (Jones & Wood, 1988). При использовании в реакции подавления роста поликлональных антисывороток *Mscpr* дает перекрестные реакции с *M. leachii* (PG50), *M. equigenitalium* и *M. primatum*, но для РПР получено МАб, специфическое к *Mscpr* (Rurangirwa *et al.*, 1987c). Данное МАб, WM25, согласно сообщениям, демонстрирует специфичность к изолятам (*Mscpr*) при применении метода РПР с использованием дисков, что позволяет исключать *M. agalactiae*, *Msc* и других членов «кластера *mycoides*», вызывающих заболевания у коз, но не членов группы 7, вызывающих заболевания крупного рогатого скота (у коз, как правило, не встречаются). Но последние можно исключить, исследуя колонии при помощи реакции непрямой иммунофлуоресценции. Небольшая часть изолятов *Mscpr* характеризуется также перекрестным реагированием в ходе РПР с сывороткой, содержащей антитела к штаммам *Msc*. В редких случаях у коз могут обнаруживаться штаммы *Mycoplasma leachii*. Результаты следует интерпретировать с осторожностью, поскольку методом РПР с использованием «специфической» антисыворотки были ошибочно определены некоторые штаммы, поражающие крупный рогатый скот.

#### • Протокол исследования

- a) Бульонную культуру во второй половине фазы логарифмического роста используют в трех десятикратных разведениях, выбор которых зависит от роста изолята на агаре.
- b) Агаровые пластины сушат в течение 30 минут при 37°C.
- c) Стерильные бумажные диски 6–7 мм в диаметре пропитывают каплей (10–20 мкл) неразбавленной антисыворотки. Диски можно использовать влажными, в этом виде они могут храниться при –20°C, или лиофилизированными (Dighero *et al.*, 1970), что позволяет хранить их при 4°C.
- d) Используя отдельную пластину для каждого разведения культуры, пипеткой наносят 1 мл или 2,5 мл на пластины диаметром 5 или 10 см, соответственно. Инокулят равномерно распределяют по поверхности пластины, затем излишки удаляют.
- e) Пластины сушат при 20–30°C в течение 15–20 минут, желательнее под защитным колпаком, пока с поверхности визуально не исчезнут какие-либо следы жидкости. Следует поддерживать достаточную остаточную влажность, чтобы лиофилизированные диски могли держаться на поверхности агара.

- f) Несколько дисков, пропитанных различными антисыворотками (выбранными на основании источника образца и биохимических реакций и морфологии колоний изолята), аккуратно помещают на агаровые пластины. Изоляты, полученные из материала с подозрением на наличие возбудителя ИППК, подвергают скринингу с использованием сывороток, содержащих антитела к *Mscsr*, *M. mycoides* подвида *capri* и *M. ovispneumoniae*. На пластины помещают также диск, содержащий 1,5%-й дигитонин.
- g) Пластины инкубируют при 37°C в течение 2–6 дней. Начальная инкубация в течение ночи при 27°C может повысить чувствительность теста. Результат ингибирования дигитонином, как правило, носит очевидный характер. Более сложной может оказаться интерпретация результатов ингибирования антисывороткой, когда вместо полного ингибирования может наблюдаться, скорее, подавление роста, в зависимости от вида микоплазмы, плотности колонии и силы антисыворотки. Обычно в зоне ингибирования наблюдаются колонии «прорыва». Вокруг дисков могут быть видны линии преципитации, имеющие кольцевую форму. Положительным результатом считается зона ингибирования величиной 2 мм или более.

## ii) Реакция непрямой иммунофлуоресценции

Для целей идентификации большинства микоплазм наиболее эффективными серологическими методами являются реакции прямой и непрямой иммунофлуоресценции. Они отличаются простотой, быстротой и высокой чувствительностью, а также экономно расходуют антисыворотку. Существует несколько методик, но чаще всего используется и, возможно, является оптимальной реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), использующая нефиксированные колонии на агаре. Для идентификации полевых изолятов конкретного вида достаточно сыворотки с антителами к одному штамму. Антисыворотку перед использованием подвергают разведению. В клонировании культур нет необходимости, но данный тест применяется лишь после нескольких пассажей, когда устанавливается, содержит ли культура более одного вида микоплазмы, и определяются характеристики роста присутствующего микроорганизма (микроорганизмов). Данный тест не является специфическим для *Mscsr* при использовании гипериммунной кроличьей сыворотки.

### • Протокол исследования

- a) Две агаровые пластины предварительно сушат при 37°C в течение 30 минут. Каждую пластину покрывают различным разведением исследуемой бульонной культуры, при этом величину разведения выбирают в соответствии с интенсивностью роста штамма на агаровой среде. В качестве альтернативы, каплю неразведенной культуры распределяют L-образной стеклянной палочкой по поверхности 5-сантиметровой пластины.
- b) Пластины инкубируют при 37°C до появления первых признаков роста. Если РНИФ не может быть проведена незамедлительно, пластины можно хранить до 4 недель при 4°C.
- c) Несколько блоков размером примерно 0,5–1 см<sup>2</sup> вырезают из участков, на которых колонии многочисленны, но не образуют сплошной слой. Блоки каждой агаровой культуры должны иметь одну и ту же форму, чтобы можно было распознать источник. Для каждого изолята используется своя, отличная от других, геометрическая форма. Несколько блоков каждого изолята распределяют (вверх стороной, на которой расположены колонии) на нескольких предметных стеклах, причем для каждого стекла используют различную сыворотку с антителами к микоплазме. Поверхность каждого блока, несущая колонии, помечается для дальнейшего использования с помощью надрезания одного угла.
- d) Кроличья сыворотка с антителами к микоплазме или нормальная кроличья сыворотка (в качестве контроля на дублирующий блок), надлежащим образом разведенная физраствором или фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,2, аккуратно с помощью пипетки наносится на каждый агаровый блок, пока поверхность не будет полностью покрыта раствором. Оптимальное разведение сыворотки с антителами определяется при помощи «шахматного» титрования сывороткой, содержащей конъюгат флуоресцеинизотиоцианата (FITC) с иммуноглобулинами к кроличьим антителам.
- e) Покрытые раствором блоки инкубируют на предметных стеклах при комнатной температуре в течение 30 минут в камере влажности.
- f) Все блоки, расположенные на одном стекле, помещают в 10-миллилитровую пробирку, содержащую примерно 7 мл ФСБ.
- g) Закрытые пробирки вращают на скорости 18–30 об/мин в течение 10 минут. Затем ФСБ сливают, заменяют свежим ФСБ, и пробирки снова вращают в течение 10 минут.
- h) ФСБ сливают и блоки помещают на свои предметные стекла вверх стороной, несущей колонии. Избыток жидкости удаляют.
- i) Все блоки покрывают сывороткой, содержащей конъюгат флуоресцеинизотиоцианата с иммуноглобулинами к кроличьим антителам, в оптимальном разведении.
- j) Блоки вновь инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре в камере влажности, затем помещают в пробирку, содержащие свежий ФСБ, и дважды промывают вращением, как описано выше.

- к) Блоки, вновь размещенные на свои предметные стекла вверх стороной, несущей колонии, исследуют под иммунофлуоресцентным микроскопом с использованием настроек, рекомендуемых производителем для FITC.
- **Замечания в отношении реакции непрямой иммунофлуоресценции**
- л) Рабочие разведения кроличьей сыворотки с антителами к микоплазме и сыворотки, содержащей конъюгат FITC с иммуноглобулинами к кроличьим антителам, следует хранить при 4°C, что ограничивает срок их хранения 1 неделей.
- м) Изоляты, содержащие возбудителя ИППК, следует исследовать с применением сыворотки, содержащей антитела к *Mscsp M. Mucoides*, подвид *capri*, положительные контрольные культуры должны включать типовые штаммы.
- н) Для каждой культуры должен быть включен отрицательный контроль (обработанный нормальной кроличьей сывороткой).
- о) Интерпретация результатов РНИФ может представлять затруднения. Некоторые виды, в частности, ахлеплазмы, способны к автофлуоресценции. Даже в чистых культурах какая-то часть колоний может не давать позитивного окрашивания с соответствующей антисывороткой. Это справедливо, в первую очередь, в отношении *Msc*. В других случаях неудовлетворительные результаты обычно относят на счет агаровой культуры, рост которой продолжался слишком долго, или на счет антисыворотки, которая потеряла свои свойства в результате разведения или длительного хранения.

## 2. Серологические исследования

Серологические исследования не нашли широкого применения в установлении причины вспышек плевропневмонии у коз и овец. В настоящее время доступны три метода: РСК, реакция агглютинации латекса и конкурентный иммуноферментный анализ (к-ИФА), в котором используются специфические моноклональные антитела (MAb). У коз часто встречается инфицирование микоплазмами «кластера *mucoides*», которые могут вызывать перекрестные реакции в ходе таких тестов, как РСК, где используются неочищенные препараты антигена.

Сероконверсия у животных, экспериментально инфицированных *Mscsp*, наблюдается, согласно результатам РСК, начиная с 7-9 дня после появления клинических признаков. Пик сероконверсии приходится на период с 22 по 30 день, после чего она быстро затухает. Данные наблюдения показывают, что серологические исследования должны применяться для анализа ситуации в стаде, а не к отдельным особям, и что, по возможности, нужно исследовать парные образцы сыворотки, собранные с разницей в 3-8 недель.

### 2.1. Реакция связывания комплемента (MacOwan & Minette, 1976)

Для подготовки антигена 2 литра культуры с титром выше  $10^9$  КОЕ/мл центрифугируют при 12 000 **g** в течение 1 часа при 5°C. Осадок ресуспендируют и трижды промывают физраствором перед тем, как поместить на хранение порциями объемом 0,5–1,0 мл при –20°C.

Стерильный бульон, обработанный, как указано выше, представляет собой контрольный антиген, а лиофилизированный бульон, разведенный до концентрации 200 мг/мл, служит вторым контрольным антигеном. Перед проведением теста антиген разводят в соотношении 1/60 и обрабатывают ультразвуком в течение 3 минут при малой мощности в контейнере с ледяной водой. Затем центрифугируют при 1250 **g** в течение 30 минут для удаления дебриса и хранят при –20°C. Антиген, хранившийся свыше 2–3 недель, подвергают повторному центрифугированию.

#### 2.1.1. Протокол исследования

Проводят анализ на микротитрационном планшете с U-образными лунками, используя объемы 0,025 мл, два объема, содержащие три основные гемолитические дозы комплемента, и 1,5%-ю (объем/объем) конечную концентрацию бараньих эритроцитов:

- i) Нижеперечисленные ингредиенты смешивают и инкубируют при 37°C в течение 45 минут:
- а) 25 мкл двойных разведений исследуемой сыворотки (инактивированной нагреванием при 56°C в течение 30 минут), начиная с разведения 1/2;
  - б) 25 мкл препарата антигена, содержащего две единицы антигена (разведение антигена следует определить путем «шахматного» титрования с использованием известной положительной сыворотки). Одна единица антигена соответствует наибольшему разведению антигена, дающему самый высокий титр с положительной стандартной сывороткой;
  - с) 25 мкл комплемента (3 гемолитические единицы).
- ii) Перемешивают с 25 мкл сенсibilизированных бараньих эритроцитов в конечной концентрации, равной 1,5% (объем/объем), и инкубируют планшет при 37°C в течение 45 минут.
- iii) Планшет инкубируют при 4°C в течение 1 часа для осаждения неповрежденных бараньих эритроцитов.
- iv) Считывание результатов: титром является наибольшее разведение сыворотки, связывающее 50% комплемента, то есть, вызывающее 50%-й гемолиз.

### 2.1.2. Контроль

Во всех реакциях связывания комплемента требуется наличие ряда контрольных факторов:

- i) Индикаторные системы (эритроциты + гемолизин), чтобы убедиться, что эритроциты не подвергаются лизису спонтанно.
- ii) Индикаторная система с комплементом, чтобы продемонстрировать наличие количества комплемента, достаточного для лизирования клеток.
- iii) Индикаторная система с антигеном и без комплемента, чтобы продемонстрировать, что антиген сам по себе не лизирует клетки.
- iv) Индикаторная система с сывороткой и без комплемента, чтобы продемонстрировать, что сыворотка сама по себе не лизирует клетки.
- v) Индикаторная система с комплементом и антигеном для обнаружения любой активности антигена, направленной против компонентов комплемента.
- vi) Индикаторная система с комплементом и сывороткой для обнаружения любой активности сыворотки, направленной против компонентов комплемента.

Примечание: поскольку ожидается, что многие микоплазмы, в особенности виды, принадлежащие к «кластеру *mycoides*», будут вызывать в ходе РСК перекрестные реакции, то при обнаружении положительных титров на территории, свободной от ИППК, следует провести дополнительные исследования. Образцы сыворотки, в отношении которых существуют подозрения на наличие возбудителя ИППК, должны исследоваться в ходе параллельных анализов с участием препаратов антигенов различных видов микоплазмы, в частности, *M. capricolum*, *M. mycoides* подвида *mycoides*, *M. leachii* и *M. mycoides* подвида *capri*. Антиген, дающий самый высокий титр, показывает, каким из видов инфицировано животное/стадо.

### 2.2. Реакция агглютинации латекса

В реакции агглютинации на предметном стекле используются латексные частицы, сенсibilизированные полисахаридом, вырабатываемым *Mscs* и присутствующим в надосадочной жидкости культур (Rurangirwa *et al.*, 1987a). В настоящее время данный тест применяется в Кении в целях рутинной диагностики. Он очень эффективен при вспышках заболевания, поскольку это тест на раннее выявление антигена, выполняемый с использованием капли цельной крови непосредственно после отбора пробы.

Данный тест имеет высокую чувствительность на ранней стадии развития заболевания, до тех пор, пока в сыворотке присутствует IgM. Специфичность теста до конца не определена. Может иметь место перекрестная реактивность, поскольку полисахариды, вырабатываемые *Mscs*, аналогичны полисахаридам *M. leachii* и могут быть обнаружены у других бактерий.

### 2.3. Конкурентный иммуноферментный анализ

Конкурентный иммуноферментный ИФА (к-ИФА) (Thiaucourt *et al.*, 1994) доказал свою высокую специфичность и чувствительность. Для данного теста недавно был разработан набор, содержащий предварительно сенсibilизированные планшеты и готовые реагенты, включая МАb 4/52. Сегодня это точный конкурентный анализ вместо полублокирующего теста, которым он был в исходном варианте. Новый набор прошел повторную валидацию с целью установления порогового значения, 55% РI, для достижения высокой специфичности, равной 99,9%. Тест позволяет распознавать положительные образцы в стадах, инфицированы ИППК, но его истинная чувствительность на индивидуальном уровне пока до конца не установлена. Поскольку к-ИФА отличается высокой специфичностью, он может применяться для оценки статуса стада с использованием целевого отбора проб у выздоровевших животных в исследуемых стадах, что значительно повышает чувствительность теста, не вызывая при этом каких-либо проблем со специфичностью. В Справочной лаборатории МЭБ погрешность измерения для данного вида к-ИФА была оценена в  $\pm 8$  РI.

Данный метод может применяться для оценки качества вакцин против ИППК, поскольку сероконверсия, измеренная через 1 и 2 месяца после вакцинации, пропорциональна содержанию антигена *Mscs* или сапонины. Однако корреляция между титром к-ИФА и защитой, которую обеспечивает вакцина, пока не установлена (Peuraud *et al.*, 2014).

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

### 1. Общие сведения

Успешная борьба с ИППК уже имела место в 1889 году в Южной Африке, когда была применена стратегия умерщвления больных животных и вакцинации всех коз, контактировавших с заболевшими особями. В то время вакцинация представляла собой подкожное введение препаратов, содержащих плевральную жидкость или гомогенат легочной ткани пораженных животных. В противоположность тому, что наблюдается при инфекционной плевропневмонии крупного рогатого скота, подкожная инъекция живого возбудителя (*Mscs* в случае ИППК) интактным

животным не приводила к каким-либо нежелательным воспалительным реакциям. Возможно, это содействовало успешной реализации программы по ликвидации заболевания, несмотря на кустарный характер препаратов. Тем не менее, оценка относительного вклада двух указанных мер - уничтожения больных особей и вакцинации - в борьбу с болезнью до настоящего времени не осуществлялась.

Эксперименты с целью разработки живых вакцин и оценки их специфической активности немногочисленны. Основное внимание сосредоточено на получении инактивированных препаратов, содержащих сапонин в качестве инактивирующего агента и адъюванта (Rurangirwa *et al.*, 1987b). Оптимальная доза антигена составляет 0,15 мг протеина *Mscsr* и 3 мг сапонины. В оригинальном исследовании использовался лиофилизированный концентрированный антиген, который восстанавливали раствором для разведения, содержащим сапонин в концентрации 3 мг/мл. Такая процедура обеспечивала очень долгий срок хранения концентрированного антигена (>14 месяцев), а продолжительность предоставляемой вакциной защиты от заболевания превышала 12 месяцев.

Поскольку *Mscsr* отличается прихотливостью, производство вакцин от ИППК является затратным процессом: для роста *Mscsr* требуется обогащенная питательная среда, количество получаемого продукта ограничено, процедура предусматривает процесс очистки. Кроме того, для инактивированных вакцин необходимо большее количество антигена по сравнению с живыми вакцинами.

Вакцины против ИППК должны быть безопасными. Тот факт, что живые штаммы *Mscsr* не вызывают поствакцинальных реакций, следует расценивать как преимущество для данного вида вакцин. Для инактивированных вакцин, содержащих сапонин, необходима проверка на наличие вызываемого сапонином провоспалительного эффекта, поскольку этот показатель может варьировать в зависимости от производителя или партии продукта. Не рекомендуется вакцинировать беременных животных из-за возможных осложнений, связанных с действием сапонины.

Вакцина против ИППК должна сохранять свою эффективность в течение, как минимум, 1 года и обеспечивать защиту вакцинированного животного от клинического заболевания.

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

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

### **2.1. Характеристики посевного материала**

#### **2.1.1. Биологические характеристики исходного посевного материала**

Может использоваться любой местный изолят *Mycoplasma capricolum*, подвид *capripneumoniae*, вследствие однородности данного подвида. Выбор штамма будет определяться, в основном, характеристиками роста: быстрый рост, простота очистки и концентрирования, и пр.

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

Посевные серии должны иметь следующие характеристики:

##### **i) Чистота**

Чистота может быть проверена путем случайного выбора 10 клонов *Mscsr*, полученных из посевного материала, и подтверждения идентичности 10 указанных клонов с использованием, например, специфического метода ПЦР (другие методы могут не обладать достаточной специфичностью). Вследствие прихотливости штаммов *Mscsr*, любой загрязнитель с большой вероятностью будет заглушать рост *Mscsr* и будет обнаружен с помощью данной процедуры.

##### **ii) Безвредность**

Как правило, при подкожном введении штаммов *Mscsr* восприимчивым к возбудителю козам не наблюдается воспалительных реакций. Таким образом, установление факта безвредности посевного материала представляется затруднительным (если вообще необходимым).

##### **iii) Эффективность**

Вакцины, изготовленные с использованием выбранного штамма и произведенные с соблюдением стандартных производственных процедур, при введении восприимчивым интактным козам должны обеспечивать соответствующую защиту.

#### **2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма**

Поскольку для ИППК не существует схемы валидации посевного материала с использованием лабораторных животных, подобную валидацию проводят, как минимум, один раз на восприимчивых козах. Вакцина производится в соответствии со стандартным протоколом и вводится восприимчивым животным. Для вакцинированных и невакцинированных животных обеспечивается наличие контакта с козами, инфицированными возбудителем ИППК, в течение, по меньшей мере, 3 месяцев. Ожидаемый уровень защиты должен составлять не менее 90%, при этом определенное число животных в группе должно демонстрировать статистически значимые результаты.

Если процесс инактивации или презентация конечного продукта отличаются от исходной презентации, для которой были продемонстрированы защитные свойства, необходимо проведение дополнительных исследований для доказательства иммуногенности нового конечного продукта.

## 2.2. Метод производства

### 2.2.1. Процедура

Рабочий посевной материал для производства вакцины изначально получают путем амплификации аликвоты лиофилизированного исходного посевного материала, в отношении которого доказана функция обеспечения защиты вакцинированных животных. Отсутствуют особые требования в отношении типа используемой питательной среды, при условии, что она обеспечивает удовлетворительный рост штамма *Mscpr*.

Клетки *Mscpr* подвергаются концентрированию и очищению. Особых требований в отношении данной стадии также не существует: производители могут выбрать любой метод, который кажется им подходящим, при условии, что конечный продукт очищен и свободен от чужеродных веществ, содержащихся в культуральной среде. Например, культуры можно центрифугировать на высоких скоростях (> 12,000 **g**) в течение 20 минут, осадок ресуспендируют в адекватном объеме стерильного ФСБ для промывания, после чего *Mscpr* вновь осаждают.

Можно осуществить разведение промытого концентрированного антигена *Mscpr*, чтобы скорректировать содержание протеина, а затем провести лиофилизацию. Содержимое каждого флакона должно быть скорректировано таким образом, чтобы количество протеина составляло 0,15 мг на дозу после повторного растворения вакцины. На данной стадии может проводиться первоначальная инактивация концентрированного антигена сапонином.

Конечный продукт получают путем повторного растворения лиофилизированного продукта в требуемом объеме раствора для разведения, содержащем 3 мг сапонины на дозу. Сапонин действует в качестве инактивирующего агента для *Mscpr* и в качестве адьюванта.

**Примечание:** любой процесс производства, модифицирующий содержание и характеристики антигена или тип адьюванта, требует новой валидации/ регистрации.

### 2.2.2. Требования к ингредиентам

Особые требования отсутствуют. Общие требования изложены в главе 1.1.8, особое внимание следует обратить на продукты биологического происхождения из стран с ничтожно малым риском трансмиссивной губчатой энцефалопатии.

### 2.2.3. Технологический контроль

Регулярная оценка чистоты питательной среды в период роста *Mscpr* может осуществляться методами экспресс-анализа, например, исследованием культур методом фазового контраста. Он позволяет убедиться в отсутствии загрязнения бактериями, имеющими клеточную стенку (колонии микоплазмы имеют вид едва видимых, крохотных серых пятен, тогда как бактерии, имеющие клеточную стенку, выглядят больше и ярче).

Отсутствие загрязнения питательной среды в конечном концентрированном продукте, содержащем *Mscpr*, может быть установлено такими методами, как SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия). Контроль включает антиген *Mscpr* и разведенную среду. Отсутствие загрязнения среды гарантирует, что дозировка протеина отражает содержание антигена микоплазмы, а не загрязнителей.

Количество антигена микоплазмы в концентрированном продукте оценивается по содержанию протеина. Могут использоваться любые подходящие методики, например, с использованием бицинониновой кислоты, с условием включения в тест надлежащего контроля, например, стандартного бычьего альбумина или стандартного антигена *Mscpr*.

После инактивации антигена сапонином стерильность оценивается путем посева образца на подходящую среду, поддерживающую рост *Mscpr*.

### 2.2.4. Анализ партии готового продукта

#### i) Стерильность

Для оценки стерильности следует применять стандартные процедуры с использованием репрезентативного количества флаконов (см. Главу 1.1.9 «Исследование биологического материала на стерильность и отсутствие загрязнения»).

ii) Безвредность

Если в регистрационном досье не указаны сведения о доказанной безвредности продукта, а стабильность параметров производственного процесса не подтверждена в соответствии со стандартными требованиями, изложенными в главе 1.1.8, необходимо провести проверку партии на безвредность.

Данная проверка партии конечного продукта осуществляется с целью выявления любых отклоняющихся от нормы нежелательных местных или системных реакций. Для получения разрешения на выпуск партии, как минимум, трем здоровым серонегативным козам вводят рекомендованным способом установленную дозу вакцины. Осуществляют наблюдение за животными на предмет обнаружения местных и системных реакций на вакцинацию в течение, как минимум, 14 дней. Любая нежелательная реакция, соотносимая с введением препарата, подлежит оценке и может стать причиной выбраковывания партии. Если на целевых видах животных проводится тест на определение специфической активности вакцины, наблюдения в отношении безвредности продукта, сделанные в ходе указанного теста, могут расцениваться как альтернатива описанной выше проверке партии на безвредность.

iii) Специфическая активность партии

Тестирование специфической активности партий на восприимчивых реципиентах представляется нецелесообразным из-за трудностей, связанных с размножением возбудителя ИППК. Для получения разрешения на выпуск партии могут применяться непрямые тесты с учетом соображений практичности и гуманного обращения с животными.

Три интактных особи, вакцинированных в ходе проверки партии на безвредность, должны демонстрировать в течение, как минимум, 2 месяцев после вакцинации антигеном *Mscs* стойкую, специфическую сероконверсию, характеризующуюся высокими титрами. К сожалению, в отношении серологических тестов, используемых для диагностики ИППК, не проводилась оценка корреляции между поствакцинальной сероконверсией и уровнем защиты, предоставляемым вакциной. Однако наличие достаточной специфической сероконверсии говорит о наличии в тестируемом продукте надлежащего антигена и способности указанного антигена вызывать иммунный ответ у вакцинированных животных. В настоящее время для оценки сероконверсии может быть использован вестерн-блоттинг. Альтернативой данному методу могут служить РСК или к-ИФА, определяющий антитела к индивидуальному эпитопу. Реакцию агглютинации латекса использовать нельзя, поскольку с ее помощью обнаруживают антитела к полисахариду. Рассматриваемый полисахарид можно обнаружить у других видов микоплазм «кластера *mycoides*». Кроме того, отсутствуют требования к вакцинам, касающиеся содержания в них полисахаридов (потенциальная защитная роль иммунного ответа, направленного против полисахаридов, еще предстоит исследовать).

## 2.3. Требования для получения разрешения, регистрации и лицензирования

### 2.3.1. Процесс производства

Для целей регистрации вакцины, в компетентные органы следует представить все соответствующие сведения, касающиеся производства вакцины и контроля качества (см. разделы С.2.1 и С.2.2). Указанная информация должна включать сведения в отношении трех последовательно произведенных партий объемом не менее 1/3 стандартного промышленного объема.

Методы технологического контроля являются частью производственного процесса.

### 2.3.2. Требования в отношении безвредности

i) Безопасность для целевых и нецелевых видов животных

Для получения разрешения контрольно-надзорных органов пробная партия вакцины должна пройти проверку на наличие/ отсутствие местного и системного токсического эффекта, проводимую посредством теста *in-vivo*, в ходе которого препарат вводится рекомендованным способом восьми восприимчивым козам. После инъекции животные не менее 14 дней находятся под наблюдением с целью выявления возможных местных и системных реакций на вакцинацию. Любая нежелательная реакция, соотносимая с введением препарата, подлежит оценке и может стать причиной выбраковывания партии. Из-за наличия в составе вакцины сапонина может присутствовать транзиторная лихорадка и локализованный отек.

ii) Меры предосторожности (факторы риска)

*Mscs* не представляет опасности для человека. Случайное самоинъекцирование может вызвать местное раздражение вследствие присутствия в составе вакцины сапонина.

### 2.3.3. Требования к эффективности

Для регистрации коммерческой вакцины, партия (или партии), произведенная в соответствии со стандартным методом и характеризующаяся минимальным количеством антигена или значением специфической активности, должна продемонстрировать свою эффективность (уровень обеспечиваемой защиты). Каждая будущая коммерческая партия должна проходить проверку перед выпуском с целью гарантировать, что она имеет то же значение специфической активности, что и партия (партии), использовавшиеся в тесте (тестах) на эффективность.

Оценка эффективности (уровня защиты) осуществляется у вакцинированных животных напрямую посредством анализа их устойчивости к контрольному заражению живым патогеном, в частности, в сравнении с невакцинированными контрольными животными.

Оценка эффективности проводится контактным методом в течение трех месяцев после вакцинации, когда искусственно инфицированные козы находятся в контакте с вакцинированными и интактными животными. Уровень защиты определяется по результатам наблюдения клинических признаков (дни с лихорадкой) и поражений, когда животных умерщвляют (через 1-2 месяца после появления первых симптомов заболевания в контрольной группе). Уровень защиты должен составлять не менее 90% ( $\pm 10$ ).

Вследствие консервативного характера штаммов *Mscsp*, для оценки уровня защиты, обеспечиваемого вакциной, может использоваться любой полевой патогенный штамм при условии, что он доказал свою патогенность на животных контрольной группы.

#### **2.3.4. Вакцины, в отношении которых применима стратегия DIVA (выявление инфекции у вакцинированных животных)**

Неприменимо в отношении существующих вакцин против ИППК.

#### **2.3.5. Продолжительность иммунитета**

Как часть процедуры регистрации/ лицензирования, производитель должен наглядно продемонстрировать продолжительность иммунитета (DOI) конкретной вакцины при помощи метода контрольного заражения либо альтернативного метода в конце заявленного периода обеспечения защиты от заболевания. В случае вакцин, инактивированных сапонином, данный период составляет примерно 1 год.

#### **2.3.6. Стабильность**

Как часть процедуры регистрации/ лицензирования, производитель должен наглядно продемонстрировать стабильность всех свойств вакцины в конце заявленного срока хранения. Необходимо указать температуру хранения и обеспечить наличие соответствующего предупреждения в случае, если замораживание или хранение при комнатной температуре вызывают порчу продукта.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- AMIRBEKOV M., MURVATULLOEV S. & FERRARI G. (2010). Contagious caprine pleuropneumonia detected for the first time in Tajikistan. *EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin*, **35**, 20–22.
- ARIF A., SCHULZ J., THIAUCOURT F., ТАНА А. & HAMMER S. (2005). An outbreak of contagious caprine pleuropneumonia at Al Wabra Wildlife Preservation, State of Qatar. *J. Zoo Wildl. Med.*, **38**, 93–96.
- BASCUNANA C.R., MATTSSON J.G., BOLSKE G. & JOHANSSON K.E. (1994). Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. *J. Bacteriol.*, **176**, 2577–2586.
- BOLSKE G., MATTSSON J.G., BASCUNANA C.R., BERGSTROM K., WESONGA H. & JOHANSSON K.E. (1996). Diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia by detection and identification by PCR and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 785–791.
- CHU Y., GAO P., ZHAO P., HE Y., LIAO N., JACKMAN S., ZHAO Y., BIROL I., DUAN X. & LU Z. (2011). Genome Sequence of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strain M1601. *J. Bacteriol.*, **193**, 6098–6099.
- DIGHERO M.W., BRADSTREET C.M.P. & ANDREWS B.E. (1970). Dried paper discs for serological identification of human mycoplasmas. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 750–757.
- HUTCHEON D. (1881). Contagious pleuropneumonia in angora goats. *Vet. J.*, **13**, 171–180.
- HUTCHEON D. (1889). Contagious pleuropneumonia in goats at Cape Colony, South Africa. *Vet. J.*, **29**, 399–404.
- JONES G.E. & WOOD A.R. (1988). Microbiological and serological studies on caprine pneumonia in Oman. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 125–131.
- KALINER G. & MACOWAN K.J. (1976). The pathology of experimental and natural contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Vet. Med. [B]*, **2**, 652–661.

- KIBOR A.C. & WAIYAKI P.G. (1986). Growth of mycoplasma F38 in medium B (modified Hayflick) and Newing's typtose medium. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.*, **34**, 157–159.
- LITAMOI J.K., WANYANGU S.W. & SIMAM P.K. (1990). Isolation of *Mycoplasma* biotype F38 from sheep in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, **22**, 260–262.
- LEACH R.H., ERNO H. & MACOWAN K.J. (1993). Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Garile, Edward, Theodore & Erno, 1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 603–605.
- LORENZON S., MANSO-SILVÁN L. & THIAUCOURT F. (2008). Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol. Cell. Probes*, **22**, 324–328.
- MACMARTIN D.A., MACOWAN K.J. & SWIFT L.L. (1980). A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. *Br. Vet. J.*, **136**, 507–515.
- MACOWAN K.J. & MINETTE J.E. (1976). A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, **8**, 91–95.
- MANSO-SILVÁN L. (2008). Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol. Cell. Probes*, **22**, 324–328.
- MANSO-SILVÁN L., PERRIER X. & THIAUCOURT F. (2007). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2247–2258.
- MANSO-SILVÁN L., DUPUY V., CHU Y. & THIAUCOURT F. (2011). Multi-locus sequence analysis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* for the molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Res.*, **42**, 86.
- MOHAN K., MILES R.J. & WADHER B.J. (1990). Growth and biochemical characteristics of mycoplasmas isolated from the lungs of Nigerian goats. *Zentralbl. Bakteriol. (Suppl.)*, **20**, 841–843.
- NICHOLAS R. & CHURCHWARD C. (2011). Contagious caprine pleuropneumonia: new aspects of an old disease. *Transbound. Emerg. Dis.*, **59**, 189–196.
- OZDEMIR U., OZDEMIR S., MARCH J., CHURCHWOOD C. & NICHOLAS R.A.J. (2005). Outbreaks of CCPP in the Thrace region of Turkey. *Vet. Rec.*, **156**, 286–287.
- PEYRAUD A., POUMARAT F., TARDY F., MANSO-SILVAN L., HAMROEV K., TILLOEV T., AMIRBEKOV M., TOUNKARA K., BODJO C., WESONGA H., NKANDO I., JENBERIE S., YAMI M., CARDINALE E., MEENOWA D., JAUMALLY M., YAQUB T., SHABIR M., MUKHTAR N., HALIMI M., ZIAY G., SCHAUWERS W., NOORI H., RAJABI A., OSTROWSKI S. & THIAUCOURT F. (2014). An international collaborative study to determine the prevalence of contagious caprine pleuropneumonia by monoclonal antibody-based cELISA. *BMC Vet. Res.*, **10**, 48.
- RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., KIBOR A. & CHEMA S. (1987a). A latex agglutination test for field diagnosis of caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **121**, 191–193.
- RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., KIBOR A. & CHEMA S. (1987b). An inactive vaccine for contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **121**, 397–402.
- RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., MUSOKE A.J. & KIBOR A. (1987c). Differentiation of F38 mycoplasmas causing contagious caprine pleuropneumonia with a growth-inhibiting monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, **55**, 3219–3220.
- SRIVASTAVA A.K., MEENOWA D., BARDEN G., CHURCHWARD C., AYLING R.D., SALGUERO F.J. & NICHOLAS R.A.J. (2010). Contagious caprine pleuropneumonia in Mauritius. *Vet. Rec.*, **167**, 304–305.
- THIAUCOURT F. & BOLSKE G. (1996). Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 1397–1414.
- THIAUCOURT F., BOLSKE G., LIBEAU G., LE GOFF C. & LEFEVRE P.-C. (1994). The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet. Microbiol.*, **41**, 191–203.

THIAUCOURT F., GUERIN C., MADY V. & LEFEVRE P.-C. (1992). Diagnostic de la pleuropneumonie contagieuse caprine: améliorations récentes. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **11**, 859–865.

WOUBIT S., LORENZON S., PEYRAUD A., MANSO-SILVAN L. & THIAUCOURT F. (2004). A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet. Microbiol.*, **104**, 125–132.

\*

\* \*

**Примечание:** Действует референтная лаборатория МЭБ по инфекционной плевропневмонии коз (см. Таблицу в части 4 настоящего *Ветеринарно-санитарного кодекса МЭБ по наземным животным* или веб-сайт МЭБ, где размещена обновленная версия списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> ).

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