

ГЛАВА 3.9.2

ОСПА ВЕРБЛЮДОВ

РЕЗЮМЕ

*Оспа верблюдов является широко распространенной инфекционной вирусной болезнью представителей семейства верблюдовых Старого Света. Верблюдовые Нового Света также восприимчивы к вирусу-возбудителю этой болезни. Болезнь распространена на всей территории размножения верблюдов в Африке, к северу от экватора, на Ближнем Востоке и в Азии, и наносит ощутимый удар по экономике, связанный с потерями производства и, в некоторых случаях, со смертью животных. Оспа верблюдов не встречается в популяции диких верблюдов Австралии. Вирус оспы верблюдов принадлежит к роду ортопоксвирусов (*Orthoroxvirus*) подсемейства хордопоксвирусов (*Chordoroxvirinae*) семейства поксвирусов (*Poxviridae*). Характерными симптомами болезни являются лихорадка, локальные или общие поражения в виде оспенной сыпи на коже и на слизистых оболочках рта и дыхательных путей. Клинические проявления болезни варьируются от бессимптомной инфекции до легкой, умеренной и, реже, тяжелой системной инфекции и летального исхода. Наиболее часто и в более тяжелых формах болезнь встречается у молодых животных и беременных самок. Болезнь передается либо в результате непосредственного контакта между инфицированными и восприимчивыми животными, либо в результате непрямого заражения через зараженную окружающую среду. В качестве возможного пути передачи вируса рассматривалась также его передача насекомыми, поскольку вспышки болезни часто наблюдаются после выпадения дождевых осадков. Вирус оспы верблюдов является крайне специфичным по отношению к хозяину и не заражает других животных. Случаи заражения людей зоонозным вирусом оспы верблюдов, связанные со вспышками болезни у одногорбых верблюдов (*Camelus dromedaries*), наблюдались на северо-востоке Индии на протяжении 2009 года. Этот единственный инцидент свидетельствует о том, что оспа верблюдов представляет ограниченную опасность для здоровья людей.*

Идентификация возбудителя болезни:

Предварительное диагностирование оспы верблюдов основано на клинических признаках (симптомах) болезни. Несмотря на это, заражение верблюдов контагиозной эктимой (контагиозным пустулезным дерматитом), вирусом папилломы и реакция на укусы насекомых считаются дифференциальными диагнозами данных болезней и реакций на ранних клинических стадиях, а также легких форм оспы верблюдов. Существует несколько методов диагностики болезни, и, в тех случаях, когда это возможно, для подтверждения диагноза следует использовать более одного метода диагностики.

Самым быстрым методом подтверждения факта заражения оспой верблюдов в лабораторных условиях является обнаружение с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) характерных проявлений болезни – наличия в очагах поражений на коже и в образцах ткани корок ортопоксвирусов, вирионы которых имеют кирпичеобразную форму. Вирион вируса оспы верблюдов четко отличается от овоидного вириона парапоксвируса, этиологического агента принципиально отличной болезни – контагиозного пустулезного дерматита верблюдов. Тем не менее, в результате исследования методом ПЭМ может быть установлен факт одновременного присутствия обоих вирусов, что является свидетельством наличия двойной инфекции.

Факт заражения оспой верблюдов может быть подтвержден путем обнаружения антигена вируса оспы верблюдов в тканях корок и в очагах оспенных поражений на коже с помощью иммуногистохимического исследования. Этот относительно простой метод исследования может применяться в лабораториях, в которых недоступен метод ПЭМ. Кроме того, образцы тканей, погруженные в парафин, могут храниться на протяжении долгого времени, что позволяет проведение в будущем эпидемиологических ретроспективных исследований.

Вирус оспы верблюдов может размножаться на хорионлантоисной мембране (ХАМ) оплодотворенных куриных яиц. По истечении 5 дней на ХАМ могут быть обнаружены характерные поражения. Вирус оспы верблюдов производит типичное цитопатическое действие на широкий спектр культур клеток. Внутриплазматические эозинофильные тельца включения, являющиеся характерным признаком заражения поксвирусом, могут быть обнаружены в инфицированных клетках при помощи метода гематоксилин-эозиновой окраски. Наличие вирусной нуклеиновой кислоты может быть подтверждено с помощью метода полимеразной цепной реакции, а различные штаммы вируса оспы верблюдов могут быть идентифицированы при помощи анализа рестриктазы ДНК. Также описано применение метода твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) для обнаружения вируса оспы верблюдов.

Серологические реакции: Существует широкий спектр серологических реакций, включая методы нейтрализации вируса и твердофазного ИФА, которые позволяют идентифицировать вирус оспы верблюдов.

Требования к вакцинам: На рынке имеются, как аттенуированные, так и инактивированные вакцины. Вакцинация живой аттенуированной вакциной обеспечивает защиту на 6 лет, а инактивированной вакциной – на 12 месяцев.

А. ВВЕДЕНИЕ

Оспа верблюдов встречается практически во всех странах, в которых практикуется верблюдоводство. Исключениями являются ранее упомянутые популяции одногорбых верблюдов в Австралии и мозолоногих (лама и родственные ей виды) в Южной Америке. Вспышки болезни отмечались на Ближнем Востоке (Бахрейн, Иран, Ирак, Оман, Саудовская Аравия, Объединенные Арабские Эмираты и Йемен), в Азии (Афганистан и Пакистан), в Африке (Алжир, Египет, Эфиопия, Кения, Мавритания, Марокко, Нигер, Сомали и Судан) (Mayer & Czerny, 1990; Wernery *et al.*, 1997b), а также в южных регионах России и Индии. В этих странах болезнь является эндемической, и нерегулярные вспышки наблюдаются вместе с ростом сезонной распространенности, как правило, в течение сезона дождей.

Возбудителем оспы верблюдов является вирус *Orthopoxvirus cameli*, принадлежащий к роду *ортопоксвирусов*, входящему в семейство *поксвирусов*. На основе результатов секвенирования было установлено, что вирус оспы верблюдов имеет наиболее тесное родство с вирусом натуральной оспы, этиологическим агентом вариолы (натуральной оспы). Верблюды успешно прививались против оспы верблюдов штаммами вируса вакцины. Средний размер вириона этого вируса составляет 265–295 нм. Ортопоксвирусы представляют собой оболочечные вирусы кирпичеобразной формы, наружная мембрана которых покрыта беспорядочно расположенными трубчатыми белками. Вирион вируса состоит из оболочки, наружной мембраны, двух боковых тел и ядра. Нуклеиновая кислота представляет собой двухспиральную линейную ДНК. Вирус реплицируется в цитоплазме клетки-хозяина, в так называемых тельцах включения. Вирус оспы верблюдов осуществляет гемагглютинацию «петушковых» эритроцитов, однако гемагглютинация может быть бедной (Davies *et al.*, 1975). Вирус оспы верблюдов является либо устойчивым, либо чувствительным к воздействию хлороформа (Davies *et al.*, 1975; Tantawi

et al., 1974). Вирус является чувствительным к рН 3–5 и рН 8,5–10 (Davies *et al.*, 1975). Поксвирусы восприимчивы к воздействию различных дезинфицирующих средств, включая 1% раствор гипохлорита натрия, 1% раствор гидроксида натрия, 1% раствор перуксусной кислоты, раствор формальдегида, 0,5–1% раствор формалина и 0,5% раствор соединений четвертичного аммония. Этот вирус может быть уничтожен путем автоклавирования или кипячения в течение 10 минут, а также погибает под воздействием ультрафиолетовых лучей (длина волны: 245 нм) в течение нескольких минут (Coetzer, 2004).

Инкубационный период обычно составляет 9–13 дней (варьируясь от 3 до 15 дней). Клинические проявления оспы верблюдов варьируются от бессимптомной и легкой локальной инфекции, ограничивающейся поражением кожи, до умеренных и тяжелых системных инфекций, что, возможно, отражает различия между штаммами оспы верблюдов или различия в иммунном статусе животных (Wernery & Kaaden, 2002). Характерными симптомами болезни являются лихорадка, увеличенные лимфатические узлы и поражения кожи. Поражения кожи появляются через 1–3 дня после появления лихорадки и начинают развиваться как эритемные пятна, постепенно превращаясь в папулы и везикулы, а позже – в пустулы. На месте лопнувших пустул образуются корки. Сначала поражения появляются на голове, веках, ноздрях и по краям ушей. В тяжелых случаях заболевания может опухать вся голова. Позже кожные поражения могут распространиться на шею, конечности, гениталии, молочные железы и промежность. При развитии общей формы болезни оспенные поражения могут покрыть все тело. Продолжительность лечения поражений кожи может составлять до 4–6 недель. В случае развития системной формы болезни оспенные поражения могут быть обнаружены на слизистых оболочках ротовой полости и дыхательных путей (Kritz, 1982; Wernery & Kaaden, 2002).

У животных могут наблюдаться повышенное слюноотделение, слезотечение и слизисто-гнойные выделения из носоглотки. При развитии системной формы болезни может развиваться также диарея и анорексия. У беременных самок могут случаться выкидыши. Причиной смерти, как правило, становятся вторичные инфекции и септицемия (Wernery & Kaaden, 2002).

Гистопатологическое исследование узелков на коже на ранней стадии развития болезни позволяет обнаружить характерные признаки цитоплазматического «отека», вакуолизации и баллонирования кератиноцитов наружного шиповидного слоя. Разрушение этих клеток приводит к образованию везикул и развитию локализованного отека. Также наблюдается околосоудистая инфильтрация мононуклеаров и переменная инфильтрация нейтрофилов и эозинофилов. На границах кожных поражений может наблюдаться выраженная эпителиальная гиперплазия (Yager *et al.*, 1991).

Существует лишь несколько подробных патологических описаний внутренних поражений при развитии оспы верблюдов. Эти поражения исследовались в процессе патологоанатомического исследования верблюдов, умерших в результате развития тяжелой формы оспы верблюдов. Данные поражения представляют собой множественные осподобные поражения на слизистых оболочках ротовой полости и дыхательных путей. Диаметр поражений в легких может варьироваться от 0,5 до 1,3 см и, в отдельных случаях, может достигать 4–5 см. Поражения меньшего размера могут иметь геморрагический центр. Для поражений в легких характерны гидропическая дегенерация, пролиферация бронхиальных эпителиальных клеток, инфильтрация в пораженные области макрофагов, а также развитие некроза и фиброза (Kinne *et al.*, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998a; Wernery *et al.*, 1997a). Оспенные поражения обнаруживаются также в слизистой оболочке трахеи и в сетчатке глаза, что может привести к слепоте.

Коэффициент заболеваемости оспой верблюдов является непостоянным и зависит от того, циркулирует ли вирус в стаде. Серологические исследования, проводившиеся в различных странах, позволили выявить высокий показатель распространенности антител к вирусу оспы верблюдов (Wernery & Kaaden, 2002). Показатели заболеваемости выше у самцов, чем у самок, а показатели смертности выше у молодых, чем у взрослых особей (Kritz, 1982). Показатели смертности у взрослых животных составляют от 5% до 28%, а у молодых животных – от 25% до 100% (Mayer & Czerny, 1990).

Вирус передается либо в результате прямого контакта между инфицированными и восприимчивыми животными, либо через зараженную среду. Обычно инфекция проникает в организм через дыхательные пути или через поврежденные участки кожи. Вирус секретируется в молоко, слюну, а также в выделения из глаз и носоглотки. Высохшие струпья, отпавшие от пораженной оспой кожи, могут содержать живой вирус как минимум на протяжении 4 месяцев, заражая окружающую среду. Выдвигались предположения, касающиеся передачи возбудителя заболевания членистоногими переносчиками. Вирус оспы верблюдов был обнаружен с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и выделен из организма паразитирующего на верблюдах клеща, *Hyalomma dromedarii*, обнаруженного на теле животных, зараженных вирусом оспы верблюдов. Увеличение плотности популяции клещей в сезон дождей может являться причиной распространения болезни (Wernery *et al.*, 1997a). Кроме того, потенциальными переносчиками вируса могут быть и другие насекомые, такие как жалящие мухи и комары.

Было выдвинуто предположение о том, что различные штаммы вируса оспы верблюдов могут различаться по степени вирулентности (Wernery & Kaaden, 2002). Анализ рестриктазы ДНК вируса позволяет сравнить изоляты. Несмотря на это, каких-либо значительных различий в вакцинных штаммах до настоящего времени выявлено не было (Wernery *et al.*, 1997a).

Иммунитет против вируса оспы верблюдов является, как гуморальным, так и клеточно-опосредованным. Относительная значимость этих двух механизмов в полной мере не выяснена, однако считается, что циркулирующие антитела не отражают иммунный статус животного (Wernery & Kaaden, 2002). Пожизненный иммунитет против вируса вырабатывается после естественного заражения. Живая аттенуированная вакцина обеспечивает защиту от болезни как минимум на 6 лет или, возможно, на более продолжительный срок (Wernery & Zachariah, 1999). Инактивированная вакцина обеспечивает защиту только на 1 год.

Вирус оспы верблюдов является крайне специфическим по хозяину и не поражает другие виды животных, не исключая крупный рогатый скот, овец и коз. В соответствии с принятой классификацией, вирус оспы верблюдов относится к группе риска 2 с точки зрения заражения людей, и любые манипуляции с этим вирусом должны выполняться с соблюдением необходимых правил и принятием необходимых мер предосторожности, описанных в главе 1.1.4 *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*. Меры по биологическому сдерживанию должны устанавливаться на основании анализа рисков, описанного в главе 1.1.4. Описано несколько случаев заражения вирусом людей (Kritz, 1982). Последний случай заражения людей, зафиксированный в Индии (Bera *et al.*, 2011), имел клинические проявления болезни, такие как образование папул и везикул, образование язв и, наконец, образование струпьев на пальцах и руках. Однако подобные случаи и даже случаи развития более легкой формы заболевания отмечаются редко, что свидетельствует об ограниченном характере опасности вируса оспы верблюдов для здоровья людей.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики оспы верблюдов и их назначение

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
ПЭМ	-	-	нп	+++	-	-
Выделение вируса в клеточной культуре	-	-	нп	+++	-	-
Выделение вируса на хориоаллантоисной мембране оплодотворенных куриных яиц	-	-	нп	+++	-	-
Иммуногистохимическое исследование	-	-	нп	+++	-	-
ПЦР	-	-	нп	+++	-	-

Метод	Цель					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
ПЦР в реальном времени	-	-	нп	+++	-	-
Выявление иммунной реакции						
Твердофазный ИФА	+++	+++	нп	+	+++	+++
Нейтрализация вируса	+++	+++	нп	+	+++	+++

¹ Рекомендуется применять комбинацию методов идентификации возбудителя к одному и тому же клиническому препарату.

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами;
– = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ПЭМ = просвечивающая электронная микроскопия; ПЦР = полимеразная цепная реакция; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

В течение вирусемического этапа развития болезни (первая неделя с момента появления клинических симптомов) вирус оспы верблюдов может быть выделен в культуре клеток из гепаринизированных образцов крови, а вирусная ДНК может быть выделена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) из крови в ЭДТК (этилендиаминтетрауксусной кислоте). Образцы крови должны быть собраны с соблюдением правил стерильности посредством венепункции. Образцы крови вместе с антикоагулянтом для выделения вируса из лейкоцитарной пленки должны быть помещены непосредственно на лед и обработаны в максимально короткий срок. Как показывает практика, перед обработкой образцы могут храниться при температуре 4°C до 2 дней, однако они не должны подвергаться заморозке или храниться при температуре окружающей среды.

Кровь, собираемая с целью получения образцов сыворотки, должна собираться в прозрачные пробирки без антикоагулянтов. Пробирки с кровью необходимо выдерживать при комнатной температуре в течение 4–8 часов, до тех пор, пока не начнут образовываться сгустки, после чего кровь необходимо центрифугировать с центробежным ускорением 1000 *g* в течение 10–15 минут. Сепарированная сыворотка может быть собрана с помощью пипетки и выдерживаться при температуре 4°C в течение короткого периода или храниться при температуре –20°C.

Для выделения вируса и проведения гистопатологического исследования необходимо собрать не менее 2 граммов биопсионных образцов ткани кожи и органов. Для проведения испытания методом ПЦР необходимо поместить приблизительно 30–50 мг образцов ткани в криопробирку или аналогичный контейнер, который необходимо хранить при температуре 4°C во время транспортировки и при температуре –20°C – до момента обработки. Образцы ткани, собранные с целью выделения вируса, должны быть помещены в специальную питательную среду для транспортировки вируса, такую как трис-буферный триптозный бульон или минимальная питательная среда (МПС) без фетальной телячьей сыворотки (ФТС), и храниться при температуре 4°C во время транспортировки и при температуре –80°C – до момента обработки. Материал для проведения гистологического исследования после сбора должен быть незамедлительно помещен в 10% раствор формалина, объем которого в десять раз превышает объем образца. Размер образцов не должен превышать 0,5 см × 1–2 см. Образцы, помещенные в раствор формалина, могут транспортироваться при комнатной температуре.

1. Идентификация возбудителя болезни

1.1. Просвечивающая электронная микроскопия

ПЭМ является методом быстрого обнаружения вируса оспы верблюдов в стручьях или образцах ткани. Тем не менее, для позитивной диагностики необходимо, чтобы концентрация вируса в образце была относительно высокой, и, кроме того, с помощью данного метода вирус оспы верблюдов невозможно отличить от других разновидностей *ортопоксвирусов*. Несмотря на это, в настоящее время ПЭМ является лучшим методом

определения клинических случаев оспы верблюдов и контагиозного пустулёзного дерматита, возбудителями которых являются, соответственно, вирус оспы верблюдов и парапоксвирус, хотя данные вирусы не могут быть дифференцированы методами серологических исследований и ПЦР (Mayer & Czerny, 1990).

1.1.1. Приготовление образца

Вес образца должен составлять не менее 30–50 мг. Измельчите фрагменты струпуев или ткани скальпелем со сменным лезвием или стерильными ножницами и хирургическими щипцами. Растолките образец в натрий-фосфатном буферном растворе (НФБ), объем которого превышает объем образца в пять раз, с антибиотиками (например, с 10^5 международными единицами [МЕ] пенициллина и 10 мг стрептомицина на мл), используя ступку, пестик и стерильный песок. Переместите образцы в пробирки для центрифуги, после чего заморозьте и разморозьте их от двух до трех раз, чтобы высвободить вирус из клеток. Во время разморозки перемешивайте образцы вихревым способом. Поместите пробирки на лед и однократно воздействуйте на них ультразвуком в течение 30 секунд при частоте 80 Гц. Центрифугируйте образцы в течение 10 минут с центробежным ускорением 1000 g, чтобы удалить крупные частицы и собрать надосадочную жидкость (Pfeffer *et al.*, 1996; 1998b).

1.1.2. Методика

Поместите 10 мкл вышеупомянутой надосадочной жидкости на решетки, покрытые поли-L-лизинем, и осуществляйте инкубацию при комнатной температуре в течение 5 минут. Удалите жидкость с помощью фильтровальной бумаги для хроматографии. Добавьте одну каплю 2% раствора фосфорновольфрамовой кислоты (разведенной в стерильной воде со значением pH, доведенным до 7,2 с помощью NaOH) на решетку, осуществляйте инкубацию при комнатной температуре в течение 5 минут, после чего выполните воздушную сушку. Выполните исследование решетки методом ПЭМ (Pfeffer *et al.*, 1996; 1998b).

Вирус оспы верблюдов имеет характерную кирпичеобразную форму, а его поверхность покрыта беспорядочно расположенными трубчатыми белками. Парапоксвирусы имеют немного меньший размер, а белки на их поверхности расположены упорядочено.

1.2. Выделение вируса в культурах клеток

Вирус оспы верблюдов может размножаться в большом числе культур клеток, включая следующие клеточные линии: Vero, MA-104, клетки почки макаки-резус, клетки почки детеныша хомяка (ПДХ), клетки кожи дубайского верблюда (Dubca), а также следующие первичные культуры клеток: клетки тестикул ягненка, клетки почки ягненка, клетки эмбриона верблюда, клетки почки теленка и фибробласт эмбриона цыпленка (Davies *et al.*, 1975; Tantawi *et al.*, 1974).

Приготовление образцов для выделения вируса осуществляется в соответствии с описанием, приведенным в Разделе В.1.1.1.

1.2.1. Методика

Осуществляйте инкубацию 400 мкл надосадочной жидкости в течение 1 часа при комнатной температуре и в течение ночи при температуре 4°C. Профильтруйте надосадочную жидкость, пропустив ее через фильтры с отверстиями диаметром 0,45 мкм, и внесите ее в колбу (25 см²) со сливающимися клетками. Промойте фильтр 0,5 мл стабилизирующей среды, использовавшейся в наполнении культуры клеток, и осуществляйте инкубацию жидкости в колбах при температуре 37°C в течение 1 часа.

Добавьте 6–7 мл свежей среды в колбу и продолжайте процедуру инкубации примерно в течение 10 дней. Если существует подозрение на грибковое заражение, необходимо удалить зараженную среду, а в новую среду добавить 5 мкг/мл амфотерицина В. Необходимо осуществлять наблюдение за содержимым колб ежедневно в течение 10–12 дней.

Сразу по истечении 24 часов после инокуляции могут появиться характерные признаки цитопатического действия (ЦПД) бляшкообразующего типа с образованием очагов на скругленных клетках, может происходить отсоединение клеток, образование гигантских клеток и синцитиев. Синцитии могут содержать до 20–25 ядер (Tantawi *et al.*, 1974). Рост вируса оспы верблюда на культуре клеток может быть подтвержден методами ПЭМ, ПЦР или твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) (Johann & Czerny, 1993).

1.3. Выделение вируса на хориоаллантаоисной мембране оплодотворенных куриных яиц

Вирус оспы верблюда может быть выделен на хориоаллантаоисной мембране (ХАМ) оплодотворенных куриных яиц возрастом от 11 до 13 дней. Инкубация яиц должна осуществляться при температуре 37°C. По истечении 5 дней необходимо открыть яйца, содержащие живые эмбрионы, и исследовать ХАМ на наличие характерных оспенных поражений – плотных серовато-белых оспенных пустул. Вирус оспы верблюда не становится причиной смерти эмбриона, находящегося в зараженном оплодотворенном курином яйце. Максимальная температура, необходимая для образования оспенных поражений, составляет 38,5°C. Если инкубация яиц осуществляется при температуре 34,5°C, оспенные пустулы могут иметь более плоскую форму и геморрагический центр (Tantawi *et al.*, 1974).

1.4. Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование с целью обнаружения возбудителя оспы верблюдов является относительно быстрым методом и может использоваться для постановки предварительного диагноза вместо электронной микроскопии (Nothelfer *et al.*, 1995). Почти любое поликлональное антитело против вакцинного вируса показывает в данном исследовании правдоподобные результаты, что является следствием широкой гомологичности вакцинного вируса и вируса оспы верблюдов (Nothelfer *et al.*, 1995).

1.4.1. Методика

Для проведения иммуногистохимического исследования необходимо получить образец целой пустулы. Зафиксируйте ткань в 10% растворе формалина, дегидратируйте ее с помощью батареи спиртов и поместите в парафин в соответствии со стандартами проведения процедур гистопатологического исследования. Разрежьте образец на фрагменты размером приблизительно 3 мкм и поместите его на предметные стекла. Очистите фрагменты от парафина и дегидратируйте их 3% раствором H₂O₂, приготовленным из дистиллированной воды, в течение 5 минут, после чего промойте ФСБ. Осуществляйте инкубацию образцов на предметных стеклах в течение 60 минут при температуре 37°C с моноклональным антителом против вируса осповакцины 5B4²,

² Моноклональное антитело 5B4 имеется в продаже. Для получения более подробной информации просим Вас обращаться в Референтную лабораторию МЭБ (см таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий).

разбавленным в пропорции 1/500. Удалите моноклональное антитело путем двукратного промывания холодным ФСБ. Осуществляйте инкубацию образцов на предметных стеклах в течение 30 минут с антителами к иммуноглобулину мышей, маркированными биотином. Промывайте образцы ФСБ в течение 5 минут, после чего осуществляйте их инкубацию со стрептавидин-пероксидазой в течение 30 минут. Снова промывайте образцы ФСБ в течение 5 минут, после чего в течение 10 минут добавляйте в качестве хромогена диаминобензидин (Kinne *et al.*, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998b).

1.5. Полимеразная цепная реакция

ПЦР является быстрым и чувствительным методом обнаружения ДНК ортопоксвируса. Существует описание нескольких методов ПЦР на основе геля, использовавшихся для обнаружения ДНК вируса оспы верблюда (Balamurugan *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 1994; 1997; Ropp *et al.*, 1995). Неспецифическое исследование методом ПЦР позволяет обнаруживать и дифференцировать виды рода *ортопоксвирусов* благодаря разнице размеров ампликонов (Meyer *et al.*, 1994). С помощью пары праймеров, 5'-ААТ-АСА-АГГ-АГГ-АТС-Т-3' и 5'-СТТ-ААС-ТТТ-ТТС-ТТТ-СТС-3', осуществляется амплификация нуклеотидной последовательности гена, кодирующей белок включения типа А (БВТА). Размер продукта ПЦР, специфического по отношению к вирусу оспы верблюдов, составляет 881 пару оснований.

1.5.1. Описание процедуры исследования методом ПЦР на основе геля

Взвесьте небольшую аликвоту засохших струпьев в 90 мкл лизирующего раствора (50 ммоль Трис/НСl, рН 8,0, 100 ммоль Na₂ ЭДТК, 100 ммоль NaCl, 1% раствор додецилсульфата натрия) и добавьте 10 мкл Протеиназы К (20 мг/мл, Invitrogen). Перед измельчением струпьев или ткани с помощью пестика микроцентрифужной пробирки выдерживайте образец в течение 10 минут при температуре 37°C. Добавьте еще 350 мкл лизирующего раствора и 50 мкл Протеиназы К, аккуратно перемешайте содержимое и осуществляйте инкубацию в течение 3 часов при температуре 37°C. Экстрагируйте лизированную суспензию с помощью раствора равного объема, содержащего фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (в пропорции 25/24/1) и центрифугируйте с центробежным ускорением 8000 g при температуре 4 °C в течение 1 минуты. Соберите верхнюю водную фазу и снова смешайте ее с раствором равного объема, содержащим фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (в пропорции 25/24/1). Центрифугируйте образцы с центробежным ускорением 8000 g при температуре 4°C в течение 1 минуты, после чего переместите верхнюю водную фазу в новую пробирку. Осадите ДНК путем добавления 1/10 объема (3 моль) ацетата натрия и двух объемов охлажденного до ледяного состояния абсолютного этанола. Выдерживайте полученную смесь при температуре -70°C в течение 30 минут или при температуре -20°C в течение ночи. Центрифугируйте полученную смесь с центробежным ускорением 15000 g в течение 5 минут при температуре 4°C. Удалите надосадочную жидкость и промойте осадок, образовавшийся в пробирке, 0,5 мл 70% раствора этанола. Центрифугируйте образец с центробежным ускорением 15000 g в течение 5 минут. Удалите надосадочную жидкость и выполните воздушную сушку осадка. Снова взвесьте осажденную ДНК в 10 мкл воды, не содержащей нуклеазу. Альтернативным методом экстракции ДНК является использование имеющихся в продаже комплектов для экстракции ДНК.

Амплификация ДНК осуществляется на стадии окончательного объема в 50 мкл, включающего в себя 2 мкл каждого дНТФ (10 ммоль), 5 мкл 10 × буфера ПЦР, 1,5 мкл MgCl₂ (50 ммоль), 1 мкл каждого праймера, 2,5 единиц ДНК-полимеразы *Taq*, 1 мкл матрицы ДНК и соответствующий объем воды, не содержащей нуклеазу.

Осуществляйте инкубацию образцов в термоциклере: первый цикл: 5 минут при температуре 94°C (этап начальной денатурации), второй цикл: 1 минута при температуре 94°C, 1 минута при температуре 45°C, 2,5 минуты при температуре 72°C. Повторите второй цикл 29 раз. Последний цикл: 10 минут при температуре 72°C (этап окончательной элонгации); до проведения анализа храните образцы при температуре 4°C.

Смешайте 10 мкл образца с загрузочным красильным раствором и загрузите в 1% агарозный гель в буфере (Трис/борат/ЭДТК), содержащем краситель на основе этидия бромида или цианина и нуклеиновой кислоты. Загрузите параллельную линию 100 парами оснований маркера длины ДНК. Осуществляйте сепарацию продуктов при 100 В в течение 30–40 минут, после чего выполните визуализацию при помощи прибора для УФ-просвечивания флуоресцирующих в свете или поглощающих свет объектов. Подтвердите положительные реакции, исходя их размера.

Разработан имеющийся в продаже комплект для ПЦР, который позволяет обнаруживать ДНК *ортопоксвируса* и содержит вторую «стандартную» систему амплификации, состоящую из праймеров к гену гемагглютинина (ГА) ортопоксвируса. Ампликон может быть секвенирован и идентифицирован путем сравнения с уже существующими последовательностями ортопоксвируса.

1.6. ПЦР в масштабе реального времени

Небольшое количество материала для исследования (кровь, фрагменты пораженной кожи, ткань) взвешивается в 200 мкл лизирующего буфера и 20 мкл протеиназы К и инкубируется при температуре 65°C в течение 1 часа. Лизированный образец экстрагируется равным объемом раствора, содержащего фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (в пропорции 25:24:1) и центрифугируется с центробежным ускорением 8000 *g* в течение 10 минут. Верхняя водная фаза переносится в чистую пробирку, после чего выполняется осаждение ДНК путем добавления 1/10 объема (3 моль) ацетата натрия и 2,5 объемов охлажденного до ледяного состояния абсолютного этанола. Полученная смесь выдерживается при температуре –20°C в течение 1 часа, после чего центрифугируется с центробежным ускорением 13000 *g* в течение 10 минут. Надосадочная жидкость удаляется, и оставшийся осадок промывается 0,5 мл 70% раствора этанола. Высушенная осажденная ДНК повторно взвешивается в 30 мкл воды, не содержащей нуклеазу. Альтернативным методом экстракции ДНК является использование имеющихся в продаже комплектов для экстракции ДНК.

С целью стандартизации ПЦР, ДНК, экстрагированная из очищенного вируса, используется для амплификации 166 единиц основания продукта, полученного из гена ГА генома вируса оспы верблюдов. Исследование методом ПЦР проводится на 20 мкл вступающего в реакцию вещества, содержащего 2 мкл 10 × рабочего буферного раствора ПЦР, 1,6 мкл MgCl₂ (25 ммоль), 0,4 мкл дНТФ (10 ммоль), (0,4 мкл) ДНК-полимеразы *Taq*, 5 единиц/мкл, 2 мкл ДНК (приблизительно 50–100 нг), 6 пкмоль каждого праймера и 2,5 пкмоль каждой пробы.

Исследование состоит из следующих циклов:

Этап	Температура	Время	Режим сбора данных	Число циклов
Начальная денатурация	95°C	10 минут		1

Аmplификация	95°C	10 секунд	Единовременный	40
	60°C	20 секунд (один раз)		
Плавление	95°C	00 ³	Непрерывный	1
	60°C	30 секунд		
	95°C	00 ⁴		

Положительный результат определяется амплификацией, что позволяет установить пороговые значения для циклов (Ct), равные 37 или меньше.

2. Серологические реакции

Все вирусы рода *ортопоксвирусов* серологически демонстрируют перекрестные реакции. Несмотря на это, среди всех вирусов, относящихся к этому роду, только вирус оспы верблюдов может вызывать у верблюдов оспенные поражения. Парапоксвирус и вирус оспы верблюдов не демонстрируют перекрестных реакций, поэтому между оспой верблюдов и контагиозным пустулезным дерматитом верблюдов на основании серологических реакций может быть установлено различие. Большинство стандартных серологических исследований являются очень трудоемкими и требуют больших затрат времени, что делает их неподходящими для постановки предварительного диагноза. Несмотря на это, серологические реакции являются ценным инструментом для вторичного подтверждающего исследования и ретроспективных эпидемиологических исследований в тех регионах, где вакцинация против вируса оспы верблюдов не проводится.

2.1. Реакция нейтрализации вируса

Этот метод заключается в титровании тест-сывороток относительно постоянного титра вируса оспы верблюдов (100 единиц TCID₅₀ [полуинфицирующая доза культуры ткани]) на клетках Vero.

2.1.1. Методика

- i) Сыворотки инактивируются при температуре 56°C в течение 30 минут на водной бане.
- ii) Выполняется двукратное последовательное разведение сывороток на 96-луночном плоскодонном микротитрационном планшете в среде для культивирования клеток, не содержащей сыворотку (объем: 25 мл). В каждое исследование необходимо также включить индивидуальные контрольные сыворотки вместе с отрицательными (негативными) и известными положительными (позитивными) контрольными сыворотками.
- iii) Разведение образца вируса осуществляется до достижения его содержания в 100 единиц полуинфицирующей дозы культуры ткани на 25 мкл; приготовление осуществляется с использованием среды для культивирования сыворотки, не содержащей сыворотку и содержащей антибиотики.
- iv) 25 мкл раствора соответствующего образца вируса добавляется в каждую лунку, содержащую 25 мкл каждого разведения (раствора) сыворотки, за исключением лунок, содержащих контрольную сыворотку, и лунок, содержащих контрольные клетки, на каждом предметном стекле с препаратом.

³ Для этого этапа характерна непрерывность, поскольку температура повышается до 95°C, затем на 30 секунд понижается до 60°C, после чего, перед завершением цикла, снова возрастает до 95°C.

v) Препараты накрываются и инкубируются в течение 1 часа при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂.

vi) Клеточная суспензия готовится от 3 до 4 дней на старых клетках Vero с использованием концентрации, обеспечивающей образование слившихся монослоев в лунках микротитрационного планшета в течение 18–24 часов после посева клеток.

vii) Клеточная суспензия объемом 100 мкл добавляется в каждую лунку, предметные стекла заклеиваются клейкой лентой, и препараты инкубируются при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂ в течение 3–4 дней.

viii) Предметные стекла с препаратами исследуются с помощью микроскопа на наличие ЦПД, после чего результаты заносятся в рабочий журнал. Лунки относят к положительным с точки зрения нейтрализации вируса, если 100% монослоя клеток остается невредимым. Самым высоким разведением сыворотки, способствующим полной нейтрализации вируса (с отсутствием ЦПД) в половине лунок, является 50% конечный титр этой сыворотки. В случае необходимости титр может быть определен методом Спирмена-Кербера. Титр, равный 1/8 или выше, считается положительным.

2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ для обнаружения антител против вируса оспы верблюдов

Следующее описание процедуры обнаружения антител против *Orthopoxvirus cameli* методом твердофазного ИФА дает общие представления о ней (Azwai *et al.*, 1996; Pfeffer *et al.*, 1998b).

2.2.1. Приготовление антигена

i) Соберите культуру клеток, на 100% зараженную вирусом оспы верблюдов. Заморозьте и разморозьте культуру от двух до трех раз. В течение 30 секунд воздействуйте на лед ультразвуком (80 Гц), чтобы высвободить вирус из клеток.

ii) Центрифугируйте с центробежным ускорением 1000 g в течение 10 минут и соберите надосадочную жидкость.

iii) Центрифугируйте надосадочную жидкость с центробежным ускорением 45000 g при температуре 4°C в течение 1 часа. Повторно суспендируйте осадок в ФСБ.

iv) Добавьте NaCl с окончательной концентрацией 330 ммоль и полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000) с окончательной концентрацией 7%.

v) Перемешивайте образец в течение ночи при температуре 4°C, центрифугируйте с центробежным ускорением 3000 g при температуре 4°C в течение 10 минут, после чего дважды промойте осадок раствором NaCl концентрацией 15 ммоль.

vi) Заморозьте и разморозьте образец, после чего обрабатывайте его 1% неионогенным детергентом (Nonidet P40, Sigma) при температуре 37°C в течение 3 часов.

vii) Заморозьте и разморозьте образец, после чего центрифугируйте его с центробежным ускорением 3000 g в течение 10 минут при температуре 4°C.

viii) Соберите надосадочную жидкость и диализируйте образец не менее трех раз с помощью ФСБ.

ix) Измерьте концентрацию протеина с помощью определенной процедуры (Lowry *et al.*, 1951).

х) Храните аликвоты при температуре -20°C .

2.2.2. Приготовление конъюгата с пероксидазой хрена из антител сыворотки крови кролика к иммуноглобулину G верблюдов

Конъюгат с пероксидазой хрена из антител сыворотки крови кролика к иммуноглобулину G верблюда отсутствует на рынке. Существует описание метода производства моноклональных антител к иммуноглобулину М и иммуноглобулину G верблюдов (Azwai *et al.*, 1995). Несмотря на это, конъюгат с пероксидазой хрена из антител сыворотки крови кролика к иммуноглобулину G верблюдов, может быть заменен на доступный на рынке конъюгат протеина А золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) / хрена.

i) Дважды осадите сыворотку крови верблюда, добавляя насыщенный сульфат аммония с окончательной концентрацией 40% (объемное содержание) (29,6% сульфата аммония [процентное соотношение веса и объёма]) при комнатной температуре. Центрифугируйте с центробежным ускорением 12000 *g* в течение 15 минут и разведите в ФСБ (рН 7,2). Диализируйте поочередно несколькими порциями ФСБ на протяжении ночи.

ii) Сепарируйте иммуноглобулин методом гельфильтрационной хроматографии (хроматографии с проникновением в гель): столбик АСА-34 (ЛВК) (2,6 × 100 см) может быть использован для сепарации иммуноглобулинов, осажденных солями (иммуноглобулина М и иммуноглобулина G), по размеру. Элюирование может быть осуществлено с помощью ФСБ (20 мл/час), после чего могут быть собраны 6-мл фракции. Определите концентрацию протеина методом абсорбции при размере 280 нм.

2.2.3. Производство антисыворотки

Осуществите иммунизацию кроликов путем подкожного введения иммуноглобулина G верблюдов, эмульсированного в соответствующем адьюванте. Иммунизация животных должна выполняться три раза с целью усиления производства антител. Соберите сыворотку и до момента использования храните ее при температуре -20°C .

2.2.4. Методика

i) Нанесите на предметные стекла 96-луночного микротитрационного планшета для исследований методом твердофазного ИФА приготовленный антиген концентрацией 1 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере, 0,05 моль, рН 9,6 (100 мкл на лунку).

ii) Осуществляйте инкубацию препаратов на предметных стеклах планшета для твердофазного ИФА в камере влажности (при влажности 100%) при температуре 37°C в течение 1 часа, а затем на протяжении ночи при температуре 4°C .

iii) Вымойте несвязанный антиген с помощью ФСБ, содержащего 0,05% полисорбата Твин 20 (ФСБ/полисорбат Твин), три раза.

iv) Добавьте 100 мкл тест-сыворотки и контрольной сыворотки с предварительно определенной величиной оптимального разведения в блокирующем буфере (ФСБ,

содержащем 0,05% полисорбата Твин 20, и 1% обезжиренного молочного порошка) в дублирующиеся лунки.

v) Осуществляйте инкубацию препаратов в течение 30 минут при температуре 37°C.

vi) Три раза промойте предметные стекла раствором ФСБ/полисорбат Твин.

vii) Разведите конъюгат с пероксидазой хрена из антител сыворотки крови кролика к иммуноглобулину G верблюдов или конъюгат протеина А золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) / хрена с соблюдением предварительно определенной рабочей величины разведения в блокирующем буфере и добавьте 100 мкл в лунки.

viii) Осуществляйте инкубацию препаратов при температуре 37°C в течение 30 минут.

ix) Три раза промойте предметные стекла раствором ФСБ/полисорбат Твин.

x) Сделайте реакцию видимой с помощью 100 мкл хромогена 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) на лунку и осуществляйте инкубацию в течение 15 минут при температуре 37°C, встряхивая препарат.

xi) Через 10 минут остановите реакцию с помощью 2 молей H₂SO₄ при объеме 50 мкл на лунку.

xii) Измерьте значения с помощью фотометра (экспонометра) при длине волны 450 нм. Серопозитивная реакция может быть определена как значения выше среднего при стандартном среднем квадратическом отклонении +2 от негативной контрольной сыворотки.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

С1. Живая аттенуированная вакцина

1. Вводная информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование препарата

В настоящее время живые аттенуированные и инактивированные вакцины доступны на рынке. Живая аттенуированная вакцина была приготовлена из штамма, выделенного в организме детеныша одногорбого верблюда, зараженного вирусом оспы верблюдов, вызывавшим общие симптомы болезни (Wernery, 2000). Живая аттенуированная вакцина обеспечивает длительную защиту от вируса оспы верблюдов (Wernery & Zachariah, 1999). Несмотря на это, рекомендуется проводить повторную вакцинацию молодых животных в возрасте от 8 до 12 месяцев через 2–3 месяца после первой вакцинации во избежание интерференции с антителами материнского происхождения. При использовании инактивированной вакцины вакцинация животных должна проводиться ежегодно.

Инструкции по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин.*

2. Описание производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Образцы (такие как образцы корок, образующихся в носу, и образцы пораженной кожи и струпьев) собираются у верблюжат, имеющих общие симптомы оспы верблюдов. Образцы измельчаются в МПС с антибиотиками, центрифугируются, фильтруются с помощью стерильного фильтра и инокулируются на сливающиеся клетки Vero и на клеточную линию кожи эмбриона верблюда (Dubca). Показатели ЦПД изучаются через 4 дня инкубации при температуре 37°C. Когда 80% клеток заражены, культура клеток собирается, замораживается и размораживается. Эта процедура выполняется три раза, после чего осуществляется воздействие на лед ультразвуком (80 Гц) с целью высвобождения вируса. Жидкая часть суспензии отделяется от примесей центрифугированием, выполняемым с центробежным ускорением 1000 *g* в течение 10 минут. Надосадочная жидкость собирается, после чего факт наличия идентифицированного вируса оспы верблюдов подтверждается с помощью различных тестов. После 10-го пассажа на клетки Vero проводится тест на бляшкообразование, после чего осуществляется отбор бляшки большего размера для приготовления вакцины. Очищенный от бляшек вирус пассивируется на клетки Vero 110 раз, что позволяет аттенуировать вирус и определить его в качестве исходного вакцинного вируса (ИВВ). ИВВ хранится в лиофилизированном и замороженном состоянии при температуре –80°C.

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

Чистота и идентичность посевного вируса и клеток, используемых в производстве вакцины, должны быть подтверждены. Посевной вирус не должен быть заражен инородными вирусами, бактериями, грибами или микоплазмой.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Описание процедуры производства

Клетки, используемые в производстве вакцины, подготавливаются с помощью системы посевных материалов. Посевной вирус культивируется на клетках Vero. Когда монослой клеток становится неразрывным, клетки заражаются вакцинным вирусом. Сбор культуры клеток осуществляется тогда, когда 100% клеток заражены вирусом оспы верблюдов. Надосадочная жидкость очищается, смешивается со стабилизатором, переливается в пробирку и лиофилизируется.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Необходимо подтвердить, что культуры клеток и все продукты животного происхождения, используемые для производства и стабилизации клеток, не заражены и не загрязнены инородными вирусами, бактериями, грибами и микоплазмой.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

ЦПД проверяется в процессе культивации рабочего вирусного инокулята. Неинокулированные контрольные клетки должны сохранять свою морфологическую структуру до момента их сбора. Размножение вируса наблюдается при титрации с собранной надосадочной жидкостью.

2.2.4. Испытания партии готового препарата

i) Стерильность / чистота

Процедура испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие загрязнений описана в главе 1.1.9.

ii) Безопасность

С использованием рекомендованного способа введения каждая серия вакцины испытывается на десяти не получавших лечения особях верблюдов; при этом, рекомендованная доза вакцины вводится в организм каждого животного десять раз. На протяжении 7-14 дней животные обследуются на наличие неблагоприятных (побочных) реакций.

iii) Активность партии

Общее количество вируса, присутствующего в живой аттенуированной вакцине, титруется на культуре клеток, после чего вычисляется конечный титр.

2.3. Требования к регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Живая аттенуированная вакцина против вируса оспы верблюдов не вызывает клинических симптомов болезни у восприимчивых к вирусу верблюдов Старого и Нового света. У менее чем 1% животных наблюдается повышение температуры тела максимум на 1°C.

ii) Реверсия вирулентности

Какие-либо сообщения о реверсии вирулентности под воздействием живой аттенуированной вакцины отсутствуют.

iii) Меры предосторожности

Меры предосторожности не установлены, поскольку вирус оспы верблюдов является специфическим по хозяину.

2.3.2. Эффективность

Эффективность вакцины для восприимчивых животных демонстрируется на ранее не получавших лечение одногорбых верблюдах. Подопытные животные должны вакцинироваться два раза живой аттенуированной вакциной, а через 3 недели после последней вакцинации верблюды должны быть заражены вирулентным полевым штаммом вируса оспы верблюдов. Вирулентность вируса, которым заражаются животные, должна быть продемонстрирована путем заражения вирусом не проходивших вакцинацию контрольных животных. Вакцинированные животные не должны демонстрировать никаких клинических проявлений болезни, в то время как у группы животных, не проходивших вакцинацию, должны наблюдаться характерные клинические симптомы

оспы верблюдов. Факт выработки длительного иммунитета, обеспечиваемого живой аттенуированной вакциной, также должен быть подтвержден путем заражения вирусом вакцинированных животных через 6 лет после вакцинации. В дальнейшем эффективность живой аттенуированной вакцины должна оцениваться путем измерения количества антител против вируса оспы верблюдов через 21–30 дней после вакцинации с помощью исследований методом твердофазного ИФА и методом нейтрализации вируса.

Живая аттенуированная вакцина может обеспечить защиту одногорбых верблюдов от вируса как минимум на 6 лет, однако выработавшийся иммунитет может быть и пожизненным.

2.3.3. Стабильность

Вакцины должны храниться при температуре 4–8°C в условиях минимального попадания на них света. Срок годности вакцины определяется путем титрации вируса.

С2. Инактивированная вакцина

1. Вводная информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование препарата

Инактивированная вакцина доступна на рынке с 1992 года и используется для предотвращения болезни преимущественно в Северной Африке (El Harrak & Loutfi, 1999). Инактивированная вакцина изготавливается из штамма, выделенного в 1984 году во время вспышки болезни в Марокко в организме одногорбого верблюда, у которого наблюдались общие симптомы оспы верблюдов (El Harrak *et al.*, 1991). Инактивированная вакцина обеспечивает хорошую защиту от вируса оспы верблюдов после ее двукратного введения в организм с 3-месячным и 6-месячным интервалом, после которого проводится повторная ежегодная вакцинация животных. Использование вакцины рекомендовано для вакцинации животных в возрасте 8–12 месяцев, что позволяет избежать интерференции с антителами материнского происхождения.

Инструкции по производству ветеринарных вакцин приведены в главе 1.1.8. *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Процедура производства доступных на рынке инактивированных вакцин против вируса оспы верблюдов описана ниже.

2. Описание производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Фрагменты пораженной кожи взрослых одногорбых верблюдов, у которых наблюдаются общие симптомы оспы верблюдов, собираются, измельчаются в ФСБ с антибиотиками, центрифугируются, фильтруются с помощью стерильного фильтра и инокулируются на хорионаллантоисную мембрану яиц, не содержащих специфического патогена, с целью первичного выделения вируса (El Harrak *et al.*, 1991). Полученные фрагменты оспенных поражений кожи пассируются на линию сливающихся клеток Vero семь раз подряд. Постоянный контроль ЦПД осуществляется через 3–4 дня инкубации при температуре 35°C. Когда 80% клеток заражены, вирусная суспензия собирается, замораживается и размораживается. Эта процедура выполняется дважды с целью высвобождения вируса.

Суспензия собирается, после чего с помощью различных испытаний подтверждается факт идентификации вируса оспы верблюдов. После восьми пассажей вирус определяется в качестве исходного вакцинного вируса (ИБВ) и указанного штамма Laayoune T8. ИБВ хранится в замороженном состоянии при температуре -80°C .

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

Чистота, идентичность и титр посевного вируса, а также чистота клеток Vero, используемых в производстве вакцины, должны быть подтверждены. Посевной вирус не заражен и не загрязнен инородными вирусами, бактериями, грибками или микоплазмой.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Штамм Laayoune T8 валидирован и утвержден в качестве вакцинного штамма после трех успешных пассажей на клетки Vero с помощью метода серийных разведений, позволяющего очистить вирус. Характеристики ЦПД и титр вируса являются воспроизводимыми. Отсутствие посторонних веществ подтверждено.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Описание процедуры производства

Посевной вирус выращивается на клетках Vero. Клетки, используемые в производстве вакцины, подготавливаются с помощью системы посевных материалов. Заражение посевным вирусом сливающихся клеток Vero осуществляется в роллерных флаконах или в биогенераторе с микроносителями. Вирусная суспензия собирается, когда клетки заражены вирусом оспы верблюдов на 80%. Вирус инактивируется с помощью β -пропиолактона, после чего смешивается с гидроксидом алюминия, используемым в качестве адьюванта, и помещается во флаконы.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Необходимо подтвердить, что вирус, культуры клеток и все продукты животного происхождения, используемые в производстве, не заражены и не загрязнены инородными вирусами, бактериями, грибками и микоплазмой.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

Стерильность и чистота клеток проверяются в процессе производства. Собранный вирус проверяется на стерильность и инфекционный титр; инактивированный антиген также проверяется на стерильность и полноту инактивации.

2.2.4. Испытания партии готового препарата

i) Стерильность / чистота

Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие заражений / загрязнений описаны в главе 1.1.9.

ii) Идентичность

Идентичность вакцинного вируса может быть подтверждена методом ПЦР на инактивированном конечном продукте.

iii) Безопасность

С использованием рекомендованного способа введения каждая серия вакцины испытывается на двух не получавших лечения особях верблюдов; при этом, рекомендованная доза вакцины вводится в организм каждого животного два раза. На протяжении 14 дней животные обследуются на наличие неблагоприятных (побочных) реакций.

iii) Активность партии

Общее количество вируса, присутствующего в инактивированной вакцине, измеряется путем титрования на культуре клеток перед инактивацией, после чего, перед добавлением адьюванта, выполняется исследование антигена методом ПЦР в масштабе реального времени.

2.3. Требования к регистрации / разрешениям / лицензированию

2.3.1. Производственный процесс

Инактивированная вакцина против вируса оспы верблюдов производится в соответствии со стандартами надлежащей производственной практики (НПП) и процедурами, рекомендованными для производства инактивированных ветеринарных вакцин.

2.3.2. Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Инактивированная вакцина против вируса оспы верблюдов не вызывает каких-либо клинических симптомов болезни или повышения температуры тела при введении ее в организм животных, восприимчивых к вирусу оспы верблюдов. По причине наличия адьюванта в месте введения вакцины могут возникать воспалительные реакции, которые не оказывают никакого влияния на состояние здоровья животных.

ii) Реверсия вирулентности для аттенуированных / живых вакцин и учет воздействия на окружающую среду

Неприменимо к инактивированным вакцинам.

iii) Меры предосторожности (факторы риска)

Меры предосторожности не установлены, поскольку вирус оспы верблюдов является специфическим по хозяину.

2.3.3. Требования к эффективности

Эффективность вакцины демонстрируется на шести не получавших лечение детенышах одногорбого верблюда, зараженных вирулентным полевым штаммом после введения двух доз инактивированной вакцины с 3-месячным интервалом. Вирулентный штамм титровался на коже четырех вакцинированных и двух невакцинированных контрольных

животных с целью сравнения реакций. Инфекционный титр, полученный на коже вакцинированных животных, составляет как минимум 1,5 log полуинфицирующих доз, что меньше титра, полученного на коже контрольных животных. Кроме того, у вакцинированных животных не наблюдалось каких-либо общих симптомов болезни. Эффективность инактивированной вакцины также была подтверждена фактом выработки антител после вакцинации, оцененной методами твердофазного ИФА и нейтрализации вируса (Elharrak & Loutfi, 1999).

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

Вакцин, позволяющих реализовывать стратегию DIVA (обнаружения инфекции у вакцинированных животных), не существует.

2.3.5. Продолжительность иммунитета

Факт выработки продолжительного иммунитета, обеспечиваемого инактивированной вакциной, был также подтвержден путем заражения вакцинированных животных через 1 год после первичной вакцинации. Продолжительность иммунитета, обеспеченного инактивированной вакциной, составляет как минимум 1 год после введения двух доз вакцины, что было подтверждено в результате испытания, проведенного на молодых не получавших лечение одногорбых верблюдах. После многократной вакцинации продолжительность иммунитета может быть большей у взрослых особей одногорбого верблюда. Сообщения о случаях неудачной вакцинации в полевых условиях животных, не проходящих регулярную вакцинацию, отсутствуют.

2.3.6. Стабильность

Вакцины должны храниться при температуре 4–8°C в условиях минимального попадания на них света. Срок годности вакцины составляет 24 месяца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AZWAI S.M., CARTER S.D. & WOLDEHIWET Z. (1995). Monoclonal antibodies against camel (*Camelus dromedarius*) IgG, IgM and light chains. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **45**, 175–184.

AZWAI S.M., CARTER S.D., WOLDEHIWET Z. & WERNERY U. (1996). Serology of *Orthopoxvirus cameli* infection in dromedary camels: Analysis by ELISA and western blotting. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **19** (1), 65–78.

BALAMURUGAN V., BHANUPRAKASH V., HOSAMANI M., JAYAPPA K.D., VENKATESAN G., CAUHAN B. & SINGH R.K. (2009). A polymerase chain reaction strategy for the diagnosis of camelpox. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21**, 231–237.

BERA B.C., SHANMUGASUNDARAM K., SANJAY BARUA, VENKATESAN G., NITIN VIRMANI, RIYESH T., GULATI B.R., BHANUPRAKASH V., VAID R.K., KAKKER N.K., MALIK P., MANISH BANSAL, GADVI S., SINGH R.V., YADAV V., SARDARILAL, NAGARAJAN G., BALAMURUGAN V., HOSAMANI M., PATHAK K.M.L. & SINGH R.K. (2011). Zoonotic cases of camelpox infection in India. *Vet. Microbiol.*, **152**, 29–38.

- COETZER J.A.W. (2004). Poxviridae. *In: Infectious Diseases of Livestock, Second Edition, Vol. 2*, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, 1265–1267.
- DAVIES F.G., MUNGAI J.N. & SHAW T. (1975). Characteristics of Kenyan camelpox virus. *J. Hyg.*, **75**, 381–385.
- EL HARRAK M. & LOUTFI C. (1999). Camel pox in the calf in Morocco. Identification of the virus. Vaccine Development and Application to Prophylaxis. Int. Workshop of Young Camel, Ouarzazate, Morocco, 24–26 October 1999. http://remvt.cirad.fr/CD/EMVT00_2.PDF
- EL HARRAK M., LOUTFI C. & BERTIN F. (1991). Isolation and identification of camel poxvirus in Morocco. *Ann. Rech. Vet.*, **22** (1), 95–98.
- JOHANN S. & CZERNY C.-P. (1993). A rapid antigen capture ELISA for the detection of orthopox viruses. *J. Vet. Med. [B]*, **40**, 569–581.
- KINNE J., COOPER J.E. & WERNERY U. (1998). Pathological studies on camelpox lesions of the respiratory system in the United Arab Emirates (UAE). *J. Comp. Pathol.*, **118**, 257–266.
- KRITZ B. (1982). A study of camelpox in Somalia. *J. Comp. Pathol.*, **92**, 1–8.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- MAYER A. & CZERNY C.-P. (1990). Chapter 4, Camelpox virus. *In: Virus Infections of Vertebrates, Vol. 3, Virus Infections of Ruminants*, Dinter Z. & Morein B., eds. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, The Netherlands, 19–22.
- MEYER H., PFEFFER M. & RZIHA H.-J. (1994). Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of *Orthopoxvirus* species by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1975–1981.
- MEYER H., ROPP S.L. & ESPOSITO J.J. (1997). Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *J. Virol. Methods*, **64**, 217–221.
- NOTHELFER H.B., WERNERY U. & CZERNY C.P. (1995). Camel pox: antigen detection within skin lesions – Immunohistochemistry as a simple method of etiological diagnosis. *J. Camel Pract. Res.*, **2** (2), 119–121.
- PFEFFER M., MEYER H., WERNERY U. & KAADEN O.-R. (1996). Comparison of camelpox viruses isolated in Dubai. *Vet. Microbiol.*, **49**, 135–146.
- PFEFFER M., NEUBAUER H., WERNERY U., KAADEN O.-R. & MEYER H. (1998a). Fatal form of camelpox virus infection. *Vet. J.*, **155**, 107–109.
- PFEFFER M., WERNERY U., KAADEN O.-R. & MEYER H. (1998b). Diagnostic procedures for poxvirus infections in camelids. *J. Camel Pract. Res.*, **5** (2), 189–195.

ROPP S.L., JIN Q., KNIGHT J.C. MASSUNG R.F. & ESPOSITO J.J. (1995). PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2069–2076.

TANTAWI H.H., SABAN M.S., REDA I.M. & EL-DAHABY H (1974). Camelpox virus in Egypt I – Isolation and Characterization. *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, **22** (4), 315–319.

WERNERY U. (2000). Production of an attenuated camelpox vaccine (Ducapox). *J. Camel Pract. Res.*, **7** (1), 117–119.

WERNERY U. & KAADEN O.-R. (2002). Camel pox. *In: Infectious Diseases in Camelids*, Second Edition, Wernery U. & Kaaden O.-R., eds. Blackwell Science Berlin, Germany, 176–185.

WERNERY U., KAADEN O.-R. & ALI M. (1997a). Orthopox virus infections in dromedary camels in United Arab Emirates (U.A.E.) during winter season. *J. Camel Pract. Res.*, **4** (1), 51–55.

WERNERY U., MEYER H. & PFEFFER M. (1997b). Camel pox in the United Arab Emirates and its prevention. *J. Camel Pract. Res.*, **4** (2), 135–139.

WERNERY U. & ZACHARIAH R. (1999). Experimental camel pox infection in vaccinated and unvaccinated dromedaries. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis.*, **46** (2), 131–136.

YAGER J.A., SCOTT D.W. & WILCOCK B.P. (1991). Viral diseases of the skin. *In: Pathology of Domestic Animals*, Fourth Edition, Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 629–644.

* * *

NB: Существует Референтная лаборатория МЭБ по диагностике оспы верблюдов (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов, реагентов и вакцин против оспы верблюдов, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.