

ГЛАВА 2.1.19. *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных*

(NB: Версия, принятая на Всемирной ассамблее делегатов МЭБ в мае 2016 г.)

ЧУМА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ЧУМЫ КРС)

РЕЗЮМЕ

*В прошлом классическая чума крупного рогатого скота (КРС) являлась острым, вирусным заболеванием КРС, яков, диких африканских буйволов (*Syncerus caffer*) и азиатских буйволов (*Vibulus bubalis*), характеризующимся высокой заболеваемостью и смертностью. Инфекция также могла поражать овец, коз, свиней и диких копытных. В период с 2002 по 2011 годы полевых случаев чумы КРС зарегистрировано не было. Кампания по искоренению данного заболевания завершилась в 2011 г. декларацией глобальной свободы от чумы КРС.*

Существующие коллекции вирулентных и аттенуированных вирусов чумы КРС, хранящиеся в исследовательских лабораториях и на зарегистрированных предприятиях по производству вакцин, подлежат секвестрации. С целью не допущения случайной утечки вируса из лаборатории Всемирная организация по охране здоровья животных (МЭБ) совместно с ФАО¹ придерживается стратегии международного надзора и регулирования учреждений, в которых хранится вирус чумы КРС. Все диагностическая, исследовательская деятельность и деятельность по производству вакцин, в которых используется вирус чумы КРС или материалы, содержащие вирус чумы КРС, должны осуществляться только в учреждении, поднадзорном ФАО/МЭБ.

Чума КРС остается заболеванием, подлежащим уведомлению в МЭБ, и в связи с этим на случай неожиданной утечки вируса продолжают действовать соответствующие программы надзора с целью раннего выявления клинических случаев болезни. МЭБ (совместно с ФАО) будет обеспечивать постоянный доступ к обучающим материалам, содержащим описание клинических признаков чумы КРС у живых животных.

Описание болезни: *Клиническая диагностика классической чумы КРС начинается с обнаружения погибшего животного или небольшой группы сильно пораженных животных с одним или более из следующих признаков: повышение температуры тела, отсутствие аппетита, угнетенное состояние, истощение, поверхностные эрозии в области верхней и нижней губы и десны, изъязвление или сглаживание щечных сосочков, серозные или слизисто-гнойные выделения из глаз и/или носа, диарея и лежащее положение в терминальной стадии. Вероятнее всего, в группе будет несколько павших животных с такими поражениями. Более подробное описание клинических признаков представлено части «Введение» данной главы.*

Идентификация возбудителя: *В основе лабораторного подтверждения лежит демонстрация присутствия вируса, вирус-специфической РНК или преципитирующих антигенов в образцах селезенки, лимфоузлов или выделений из носа и глаз животных с острой формой заражения.*

Серологические тесты: *Для обнаружения антител к вирусу чумы КРС у животных с подозрением на полевую инфекцию или вакцинированных против чумы КРС используют*

¹ ФАО: Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН

конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Выбранный тест должен быть чувствительным к той линии вируса, которая, вероятно, вызвала заражение, а также обладать высокой специфичностью. В этих же целях также проводят оценку уровня нейтрализующих антител. Как и в случае с вирусом, исследования проб сыворотки от животных с подозрением на чуму КРС могут проводиться только в утвержденных МЭБ лабораториях, обеспечивающих высокую степень биобезопасности.

Требования к вакцинам: *Существует живая аттенуированная вакцина против чумы КРС на основе культуры клеток. На данный момент вакцинация против чумы КРС разрешена только в условиях вивария. В связи с тем, что учреждения, в которых содержится вирус чумы КРС, находятся под наблюдением и контролем международных компетентных органов, хранение вакцинного посевного вируса и дальнейшие манипуляции с ним могут происходить только под надзором международных организаций.*

С целью подготовки к возможной случайной утечке вируса чумы КРС и согласно международному соглашению о секвестрации ФАО и МЭБ совместно со странами-членами разработали стратегический план для постэрадикационного периода, включающий международный план по действиям в чрезвычайной ситуации и предусматривающий назначение минимального количества референтных центров/лабораторий и создание банков вакцин для вынужденной вакцинации.

А. ВВЕДЕНИЕ

В прошлом классическая чума крупного рогатого скота (КРС) являлась острым, вирусным заболеванием КРС, яков, диких африканских буйволов (*Syncerus caffer*) и азиатских буйволов (*Bubalus bubalis*), характеризующимся высокой заболеваемостью и смертностью. Инфекция также могла поражать овец, коз, свиней и диких копытных. В период с 2002 по 2011 гг. полевых случаев чумы КРС зарегистрировано не было. Кроме того, в период до января 2011 г. Научный комитет по болезням животных МЭБ внимательно изучил обширный список заявок, поступивших из стран по всему миру (как научно-обоснованных, так и подтвержденных историческими данными), на признание страны свободной от чумы КРС. Этот процесс завершился в 2011 г. декларацией глобальной свободы от чумы КРС.

В ближайшем будущем существующие коллекции вирулентных и аттенуированных вирусов чумы КРС, хранящиеся в исследовательских лабораториях и на зарегистрированных предприятиях по производству вакцин, подлежат секвестрации. С целью недопущения случайной утечки вируса из лаборатории Всемирная организация по охране здоровья животных (МЭБ) совместно с ФАО следует принципам международного надзора и регулирования учреждений, в которых хранится вирус чумы КРС, за счет сведения к минимуму количества хранилищ. Все диагностическая, исследовательская деятельность и деятельность по производству вакцин с применением вируса чумы КРС или материалов, содержащих вирус чумы КРС, должна осуществляться только в учреждении, поднадзорном ФАО/МЭБ.

Чума КРС остается заболеванием, подлежащим уведомлению в МЭБ, и в связи с этим на случай неожиданной утечки вируса продолжают действовать соответствующие программы надзора с целью раннего выявления клинических случаев болезни. МЭБ (совместно с ФАО) будет обеспечивать постоянный доступ к обучающим материалам, содержащим описание клинических признаков чумы КРС у живых животных. Опубликовано последнее изложение истории чумы КРС, ее искоренения и социально-экономического влияния (Roeder & Rich, 2009).

Возбудителем чумы КРС является вирус с РНК с отрицательной цепью, который относится к роду *Morbillivirus* семейства *Paramixoviridae*. Вирус существует в виде трех ветвей, четко различающихся по своему географическому распространению: африканских линий 1 и 2 и азиатской линии 3, при этом вакцинация против одной из ветвей обеспечивает полноценную защиту против двух других, а дифференциацию вирусов, принадлежащих к разным ветвям, осуществляют только молекулярными методами. Вакцинный вирус чумы КРС на основе тканевой культуры был получен из другого генетически отличного вируса, занесенного в Африку из Азии в 19-ом веке. Классическое описание чумы КРС представляет собой следующее: чума КРС – болезнь домашнего КРС, яков, диких африканских буйволов и азиатских буйволов с высокой смертностью. Вирус также поражает свиней и многие другие виды диких животных отряда *Artiodactyla*, хотя не всегда в клинически выраженной форме; последние исследования показали, что овцы и козы также являются восприимчивыми животными, однако, их эпизоотологическая значимость как хозяев вируса невелика (Taylor & Barrett, 2007).

Хотя со временем некоторые штаммы чумы КРС стали вызывать только легкую, несмертельную форму инфекции, все штаммы сохраняют два очень опасных свойства: во-первых, почти обязательная способность изменять вирулентность и, во-вторых, способность заражать некоторые виды диких животных, а у таких видов, как африканский буйвол, антилопа канна, жираф, малый куду и бородавочник, вызывать острую инфекцию с высокой смертностью.

Чума КРС не является зоонозным заболеванием, однако, с вирусом или материалами, содержащими вирус, следует обращаться в соответствии со строгими правилами биозащиты, описанными в Главе 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Руководство по управлению биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии, а также согласно Руководствам по секвестрации вируса чумы КРС.

Иллюстрированное описание болезни представлено в Атласе МЭБ трансграничных болезней животных (Fernandez & White, 2010). Инкубационный период классической формы чумы КРС составляет от 1 до 2 недель, клинические признаки включают острые приступы лихорадки, во время которых можно различить продромальные и эрозивные стадии. Продромальная стадия продолжается около 3 дней, во время этой фазы у животного наблюдается повышение температуры до 40-41,5°C, сопровождающееся частичной потерей аппетита, запорами, отеком видимых слизистых оболочек, серозными выделениями из глаз и носа, угнетенным состоянием и сухостью носового зеркала. Однако подозрение на заболевание появляется только после наступления эрозивной стадии и возникновения некротических поражений ротовой полости. Во время лихорадки на слизистой нижней губы и десны начинают появляться некротические очаги, которые быстро распространяются на верхнюю десну и твердый мозолистый валик, на нижнюю поверхность языка, на щеки и щечные сосочки, а также на твердое нёбо. По мере увеличения уже существующих очагов и появления новых в течение последующих 2-3 дней некроз быстро распространяется по всей полости рта. Большая часть отмершей ткани отпадает, обнажая участки поверхностного, негеморрагического эрозирования эпителия слизистых.

Диарея, еще один характерный признак чумы КРС, появляется через 1-2 дня после возникновения поражений в ротовой полости. Как правило, сначала диарея проявляется обильным и водянистым стулом, в котором позднее появляются слизь, кровь и частицы эпителия, в тяжелых случаях диарея может сопровождаться тенезмами. Во время эрозивной фазы некроз может наблюдаться в ноздрях, в вульве и влагалище, а также на препуциальной оболочке. У животных отмечается отсутствие аппетита, полное пересыхание носового зеркала, угнетенное и истощенное состояние, запах сероводорода при выдохе, слизисто-гнойные выделения из носа и глаз.

Показатели гибели животных зависят от штамма вируса, породы КРС и условий окружающей среды; уровень смертности варьирует от 100% (сверхострые штаммы у европейских пород КРС) до 20-30% (острые штаммы у зебу) и 0% (слабоактивные штаммы у зебу). Уровень смертности, вызванной острыми или слабоактивными штаммами, однако, может возрасти по мере распространения вируса среди большого количества восприимчивых животных. На терминальных стадиях заболевания животное находится в лежачем положении в течение 24-48 часов перед смертью. Некоторые животные погибают вследствие развития тяжелых некротических поражений, выраженного лихорадочного состояния, истощения и диареи, другие – после резкого снижения температуры тела, часто, до субнормальных значений. У выживших животных лихорадка немного ослабевает во время эрозивного периода, а затем – через 2-3 дня – температура тела быстро приходит в норму на фоне быстрого разрешения поражений в полости рта, прекращения диареи и выздоровления без осложнений.

В случае подозрения на чуму КРС во время аутопсии павшего животного следует обратить особое внимание на сычуг, который при поражении вирусом чумы КРС будет выглядеть налитым кровью или серого цвета, на пейеровы бляшки с возможными признаками некроза лимфоидной ткани, а также на отек и потемнение гребней складчатой структуры слепой, толстой и прямой кишки. Дифференциальную диагностику у КРС следует проводить с учетом таких заболеваний, как вирусная диарея КРС/болезнь слизистых оболочек и злокачественная катаральная лихорадка с использованием соответствующих лабораторных методов. Диагностика (дифференциальная диагностика) чумы КРС может осуществляться только в утвержденных МЭБ лабораториях, обеспечивающих надлежащий уровень биозащиты.

Обычно трупы погибших животных выглядят обезвоженными, истощенными и грязными. На носу и щеках присутствуют следы слизисто-гнойных выделений, глаза запавшие, конъюнктивы гиперемированы. В ротовой полости часто обнаруживают обширное отшелушивание некротизированного эпителия, участки которого всегда четко отделены от прилегающих участков здоровой слизистой. Поражения часто охватывают мягкое небо, а иногда и глотку и верхний отдел пищевода; рубец, сетка и книжка обычно не поражены; хотя иногда на дугах рубца встречаются некротические бляшки. Выраженные поражения сычуга, особенно, антрального отдела характеризуются гиперемией и петехиями, а также отеком подслизистой. Некроз эпителия придает слизистой оболочке серый цвет. Тонкий кишечник, как правило, не затронут за исключением выраженных изменений в пейеровых бляшках, которые в результате некроза лимфоидной ткани и отслоения некротизированных тканей выглядят отечными или потемневшими. Изменения в толстой кишке затрагивают илеоцекальный клапан, лимфатические фолликулы слепой кишки, а также гребни продольных складок слизистой оболочки слепой, толстой и прямой кишки. В острых случаях со смертельным исходом складки сильно воспалены, а в случае продолжительной болезни – темного цвета; в любом случае такие поражения называют «полосками зебры».

Примером легкой формы чумы КРС может служить инфекция, вызываемая вирусом чумы КРС 2 африканской линии в эндемических областях восточной Африки, инкубационный период при которой составлял от 1 до 2 недель, а клинические проявления у КРС ограничивались подострыми приступами лихорадки. Повышение температуры наблюдалось не всегда; иногда лихорадка держалась всего 3-4 дня с повышением температуры всего до 38-40°C. У животных с легкой формой болезни отсутствовало угнетенное состояние, характерное для более острых форм чумы КРС. Диарея, если возникала, носила слабовыраженный характер. При более тщательном обследовании обнаруживали небольшую отечность видимых слизистых оболочек и небольшие очаги беловатого цвета на нижней десне, представлявшие собой участки воспаленного,

некротизированного эпителия (иногда размером не больше булавочной головки), а также эрозированные щечные бугорки. У некоторых животных такие поражения вообще отсутствовали либо быстро проходили сразу после возникновения. У других животных наблюдались незначительные серозные выделения из глаз или носа, но – в отличие от случаев более тяжелой формы заболевания – они не становились слизисто-гнойными.

Даже если заражение мягкой формой чумы КРС могло остаться у КРС незамеченным, вирус сохранял свою высокую инфекционность для диких животных, при этом у наиболее восприимчивых видов (лесные антилопы, например, малый куду и антилопа канна, африканские буйволы и жирафы) он вызывал лихорадку, выделения из носа, типичный эрозивный стоматит, гастроэнтерит и гибель. Коск (2006) также наблюдал, что кроме этого у африканских буйволов, инфицированных вирусом генетической линии 2, отмечалось увеличение периферических лимфоузлов, бляшкоподобные кератинизированные поражения кожи и кератоконъюнктивит. Поражения у малых куду выглядели так же, но если слепота, связанная с тяжелым кератоконъюнктивитом, была частым явлением, диарея встречалась намного реже. У антилоп канна болезнь, как правило, манифестировала некротическими и эрозивными поражениями слизистой щек на фоне обезвоживания и истощения. В связи с вышесказанным, в данных обстоятельствах обнаружение чумы КРС у любого из этих видов животных указывает на вероятность одновременной передачи вируса, даже на субклиническом уровне, стадам КРС, пасущимся в непосредственной близости, а также на возможное распространение инфекции через торговлю живыми животными.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

ДАННЫЙ РАЗДЕЛ БЫЛ ПРИНЯТ В 2012 ГОДУ И В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ РАССМАТРИВАЕТСЯ ВОПРОС О ЕГО ПЕРЕСМОТРЕ

1. Идентификация возбудителя

Любое подозрение на чуму КРС считается потенциальной угрозой для международной биобезопасности и подлежит немедленному подтверждению или исключению методами дифференциальной диагностики. В случае подтверждения диагноза необходимо принять меры к отслеживанию источника заражения при условии выделения вируса, идентификации его линии и определения вирулентности на экспериментальных животных (Anderson et al., 1996). Для данных целей имеются различные методы.

Предпочтительным образцом, по возможности, является кровь в антикоагулянте. Как правило, вирус возникает немного раньше, чем гипертермия и может сохраняться в течение 1-2 дней после начала ослабления лихорадки. Следовательно, у животных с гипертермией в крови, скорее всего, будет присутствовать вирус, поэтому они лучше всего подходят для взятия проб с целью выделения вируса. Однако, учитывая, что у отдельных животных с лихорадкой вирус может отсутствовать, на исследование необходимо отправлять образцы от нескольких животных с гипертермией. Важно обеспечить, чтобы патологического материала хватило для проведения, как минимум, двух попыток выделения вируса из образцов, отобранных при первоначальном подозрении на вспышку. Другие описываемые процедуры проводят только при наличии дополнительного количества патологического материала.

1.1. Выделение вируса

Вирус чумы КРС можно выделить методом культивирования из лейкоцитарной фракции цельной крови, собранной в гепарин или ЭДТК

(этилендиаминтетрауксусную кислоту) в конечной концентрации равной 10 международных единиц (МЕ/мл) и 0,5 мг/мл, соответственно. Образцы тщательно смешивают и доставляют в лабораторию на льду, но не замораживая. Вирус можно также выделить из образцов селезенки, предлопаточных и мезентериальных лимфоузлов павших животных; эти образцы можно замораживать для транспортировки; транспортировка должна осуществляться при соблюдении принципов биозащиты в соответствии с международными регламентами по транспортировке, описанными в Главе 1.1.2 Сбор, предоставление и хранение диагностических проб, Главе 1.1.3 Транспортировка проб животного происхождения, а также в соответствии с Руководствами по секвестрации вируса чумы КРС.

Для выделения вируса из крови, некоагулированную кровь центрифугируют при 2 500 g в течение 15 минут до образования слоя лейкоцитарной пленки между слоями плазмы и эритроцитов. Пленку отделяют настолько чисто, насколько это возможно, смешивают с 20 мл физиологического раствора и снова центрифугируют в качестве отмытки для удаления любых нейтрализующих антител, присутствующих в плазме. Получившийся клеточный осадок суспендируют в поддерживающей среде для культур клеток и аликвотами по 2 мл наносят на монослои первичных клеток почки телят, Т лимфобласты КРС, трансформированные лимфобластоидными клетками мартышки В95а, или клетки (Vero) почки африканской зеленой мартышки в роллерных пробирках. Культуральную поддерживающую среду сливают и заменяют каждые 2-3 дня, монослои исследуют под микроскопом на предмет развития цитопатогенного эффекта (ЦПЭ). Цитопатогенный эффект характеризуется преломлением, округлением клеток, ретракцией клеток с вытянутыми цитоплазматическими мостиками (звездчатые клетки) и/или образованием синцитий. Скорость развития цитопатогенного эффекта варьирует в зависимости от субстрата и, вероятно, также от штамма вируса. В первичных клетках это занимает до 12 дней, в клетках Vero – неделю, а в клетках В95а – 2-4 дня. До объявления важных образцов отрицательными возможно проведение слепых пассажей, но предпочтительным методом является введение клеточной суспензии или остатка оригинального образца внутривенно восприимчивому к чуме КРС быку с последующим повторным выделением вируса из его крови. Частичная идентификация изолятов вируса путем демонстрации специфичных для морбилливируса преципитинов в остатке инфицированных клеток, а полная – путем демонстрации специфической иммунофлуоресценции с использованием конъюгированных моноклональных антител (Mab).

Иным образом, можно использовать 20% суспензии (в отношении массы к объему) лимфоузлов или селезенки. Для приготовления таких суспензий твердые ткани мацерируют в бессывороточной поддерживающей культуральной среде с помощью стандартных гомогенизаторов или резаков, а затем вносят в описанные ранее монослои. Высвобождения вируса из твердых тканей можно добиться несколькими способами. Самый простой – с использованием пестика и ступки, хотя для этой процедуры в качестве абразивного материала нужен стерильный песок. Также ткани можно размолоть без абразива, используя цельностеклянный гомогенизатор, например, гомогенизатор Ten Broeck. Также возможно применение методов резки, например, с помощью блендеров Silverson или Waring. Вирусосодержащие суспензии очищают центрифугированием на низкой скорости. Объем посевного материала не имеет значения; рабочий объем составляет от 1 до 2 мл. В качестве антибиотиков чаще всего используют пенициллин в сочетании со стрептомицином, каждый в концентрации 100 МЕ/мл. Такой же покровный слой широкого спектра действия дает неомицин в

концентрации 50 мкл/мл. Кроме этого, включают фунгизон в концентрации 2,5 мкг/мл.

1.2. Обнаружение антигена методом иммунодиффузии в агаровом геле

Тесты на основе иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) можно проводить в чашках Петри или на стеклянных предметных стеклах для микроскопа (Foreman et al., 1983). В любом случае поверхность должна быть покрыта агаром толщиной около 4 мм с использованием 1% водного раствора любого высококачественного агара или агарозы. Лунки обычно располагают в виде шестиугольника: шесть периферических лунок вокруг одной центральной лунки. На предметных стеклах, лунки должны быть 3 мм в диаметре и располагаться на расстоянии 2 мм друг от друга. В чашках Петри лунки диаметром 4 мм располагают на расстоянии 3 мм друг от друга. Чем ближе лунки расположены друг к другу, тем короче время протекания реакции.

С помощью пипетки малого объема в центральную лунку помещают гипериммунную в отношении чумы КРС кроличью сыворотку. Таким же образом, в каждую вторую периферическую лунку (т.е. в первую, третью и пятую) помещают контрольный положительный антиген, приготовленный из мацерированных лимфоузлов кроликов, инфицированных лапинизированным штаммом чумы КРС Nakamura III. Отрицательный контрольный антиген помещают в четвертую лунку. Тестируемые антигены представляют собой экссудаты с поверхности среза селезенки или лимфоузла, представленных для тестирования; если экссудат получить невозможно, небольшую часть образца размалывают с минимальным количеством солевого раствора. Выделения из глаз можно выжать непосредственно из тампонов или путем отжима в микропипетке (ватную часть тампона отрезают и помещают в широкий конец пластикового наконечника для пипетки объемом 50-250 мкл и с помощью стержня тампона небольшой объем экссудата выдавливают из узкого конца наконечника). В лунки 2 и 6 добавляют исследуемые образцы. Реакцию лучше всего проводить при 4°C или при низкой температуре окружающей среды. Реакцию учитывают не ранее чем через 2 часа после начала теста. Положительной считают реакцию, если между лунками с контрольным антигеном и испытуемой сывороткой образуется полоса преципитации, которая соединяется с полосой преципитации контрольной сыворотки, образуя идентичную ей непрерывную линию. Если через 24 часа реакция будет отсутствовать, тест считают отрицательным. Результат реакции также считается неприемлемым, если в ходе реакции преципитации не образуется линия идентичности с контрольным положительным антигеном.

Хотя данный тест не является ни высокоспецифичным, ни высокочувствительным, он считается надежным и может быть адаптирован к полевым условиям. Положительную реакцию, полученную при исследовании образца от крупного домашнего жвачного животного, следует рассматривать, как наличие у данного животного чумы КРС. Положительную реакцию, полученную при исследовании образца от мелкого жвачного животного, следует рассматривать, как наличие у данного животного чумы КРС или чумы мелких жвачных, что требует проведения дальнейшей дифференциальной диагностики.

1.3. Гистопатология и иммуногистохимия

При патологоанатомическом исследовании производят забор тканей, которые помещают в 10% нейтральный забуференный формалин для проведения гистопатологии и иммуногистохимии; подходящими тканями являются корень

языка, заглочный лимфоузел и третье веко. Окрашенные гематоксилином и эозином срезы исследуют на наличие синцитиальных клеток и клеток с внутриядерными тельцами включений вируса. Присутствие антигенов вируса чумы КРС в этих же зафиксированных в формалине тканях можно продемонстрировать посредством иммунопероксидазного окрашивания с предварительной блокировкой активности эндогенной пероксидазы. При использовании в данном тесте поликлональной антисыворотки дифференцировать чуму КРС и чуму мелких жвачных не удастся. Однако эту проблему можно решить путем использования моноклональных антител, специфичных для чумы КРС и чумы мелких жвачных в дублирующих реакциях (Brown, 1997).

1.4. Идентификация линии методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) (Forsyth & Barret, 1995) позволяет получить ДНК, подходящую для анализа последовательности гена. Путем очистки вирусную РНК можно получить из селезенки (не идеальный вариант ввиду высокого содержания крови в этом органе), лимфоузла или миндалины (идеальный вариант), лимфоцитов периферической крови (PBLs) или мазков с глаз или с поражений в ротовой полости (в зависимости от обстоятельств). Твердые ткани (0,5–1,0 г) измельчают и гомогенизируют с добавлением 4,0 мл, мазки с глаз и ротовой полости – 1,0 мл, а очищенные лимфоциты периферической крови (из 5-10 мл цельной крови) – с добавлением 0,4 мл денатурирующего раствора в соответствии с опубликованной процедурой. Раствор D (дезинтегрирующий раствор): процедура такова, что согласно рекомендации минимизировать опасность при работе с ядовитым гуанидином тиоцианатом реакцию следует проводить в ламинарном шкафу. Ниже приведены объемы гуанидина тиоцианата для флакона объемом 250 мл, однако, эти объемы можно скорректировать для флаконов другой вместимости. Гуанидин тиоцианат не переносят из флакона, а растворяют во флаконе производителя путем добавления 293 мл стерильной дистиллированной воды, 17,6 мл 0,75 моль цитрата натрия, pH 7,0 и 26,4 мл 10% саркозила, затем нагревают до 65°C на водяной бане до растворения. Этот раствор можно хранить в течение нескольких месяцев в темном месте при комнатной температуре в ламинарном боксе. Готовый раствор D готовят путем добавления 0,36 мл 2-меркаптоэтанола до 50 мл исходного раствора. Срок хранения раствора – не больше 1 месяца.

В последние годы для быстрой очистки высококачественной РНК широко применялись спин-колонки для выделения РНК (RNeasy kit, Qiagen). Полученную в результате РНК преципитируют добавлением 2,5 объемов этанола, промывают в 70% этаноле, растворяют в стерильной воде или в TE буфере (Tris/ЭДТК, 10 мМ, pH 7,5, 1 мМ ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота)) и хранят при –70°C или при –20°C до использования. Синтез кДНК осуществляют с использованием случайных шестинуклеотидных праймеров, чтобы на этапе амплификации методом ПЦР можно было использовать нескольких разных специфичных наборов праймеров. Аликвоты полученной кДНК амплифицируют с использованием не менее трех наборов праймеров, способных обнаруживать и дифференцировать чуму КРС и чуму мелких жвачных. Эти наборы праймеров включают два «универсальных» набора на основе высококонсервативных областей в генах фосфопротеина и нуклеопротеина, которые должны обнаруживать все морбилливирусы, и наборы, специфичные для вируса чумы КРС, на основе последовательностей в генах белка слияния этого вируса. Продукты ПЦР анализируют на 1,5% (в отношении массы к объему) агарозном геле с подходящим ДНК-маркером с целью идентификации специфичного ДНК-

продукта. В каждый анализ методом ОТ-ПЦР следует включать положительный контроль, например, РНК вируса кори или вируса чумы плотоядных, и отрицательный контроль, например, стерильную дистиллированную воду вместо РНК. Положительные реакции подтверждают путем использования наборов вложенных праймеров на основе последовательностей гена F или путем секвенирования ДНК-продукта. При исследовании на наличие РНК-вирусов важно использовать на этапе ПЦР более одного набора праймеров, поскольку нуклеотидные последовательности таких вирусов могут значительно варьировать, и одно изменение на 3'-конце последовательности праймера может привести к тому, что амплификации ДНК праймерами не произойдет. Консультацию по использованию данного метода для анализа полевых образцов можно получить во Всемирной справочной лаборатории в Великобритании, которая также является Справочной лабораторией МЭБ по чуме КРС, и Справочной лабораторией МЭБ во Франции (см. Таблицу, представленную в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*).

Совсем недавно был описан простой метод ОТ-ПЦР в реальном времени (Taqman) для диагностики чумы КРС. Валидация этого метода ОТ-ПЦР в реальном времени для вируса чумы КРС показала его высокую чувствительность для супернатантов инфицированной тканевой культуры и патологического материала от экспериментально зараженного КРС. Данный метод подтвердил свою способность обнаруживать изоляты, репрезентативные для всех известных филогенетических линий вируса, и четко отличать вирус чумы КРС от вируса чумы мелких жвачных, а также от вирусов других подобных заболеваний (вирус ящура, вирус вирусной диареи КРС, герпесвирус КРС, вирус везикулярного стоматита). Аналитическая чувствительность системы праймеров и зондов L10 превышала 1-100 ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатогенная доза)/мл в зависимости от штамма вируса чумы КРС. Сравнение образцов от экспериментально инфицированных животных показало, что для целей эпизоотологического надзора образцами выбора должны быть эритроциты и мазки с конъюнктивы, которые позволяют поставить диагноз за 2-4 дня до появления клинических признаков. В случае вспышки чумы КРС портативная система ОТ-ПЦР в реальном времени в формате «одной пробирки» позволяет провести доклиническую диагностику, что способствует предотвращению дальнейшего распространения болезни.

1.5. Дифференциальный ИФА с иммунозахватом

Ни клинические признаки, ни РИД не позволяют провести дифференциальную диагностику чумы КРС и отличить ее от чумы мелких жвачных, поэтому в странах, где распространены обе болезни, при возникновении подозрений на заражение овец или коз любым из этих заболеваний, следует использовать другие тесты, например, ПЦР в реальном времени. Срочная дифференциальная диагностика возможна с помощью дифференциального ИФА с иммунозахватом (Libeau et al., 1994). В данном тесте используются моноклональные антитела против N белка обоих вирусов. Одно моноклональное антитело, реагирующее против обоих вирусов, используют в качестве иммобилизованного антитела, а второе биотинилированное моноклональное антитело, специфичное для неперекрывающегося сайта белка N антигена и специфичное либо против вируса чумы КРС, либо против вируса чумы мелких жвачных, предназначено для определения того, какой белок N был захвачен.

На ИФА-планшеты (или стрипы), обеспечивающие высокий уровень связывания белка, наносят иммобилизованные антитела в объеме 100 мкл на каждую лунку. После трех промывок в лунки добавляют по 50 мкл исследуемого образца,

разведенного 1/10 в лизирующем буфере, по 25 мкл вирус-специфического моноклонального антитела в рекомендованном производителем разведении и по 25 мкл стрептавидин пероксидазы в конечном разведении 1/3000. Затем планшеты помещают на шейкер с орбитальным вращением на 1 час при 37°C, после чего снова промывают; после добавления 100 мкл орто-фенилендиамина, планшеты повторно инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут. Реакцию останавливают добавлением 100 мкл 1 N серной кислоты, результаты, считанные при 492 нм с помощью автоматического ИФА-ридера, выражают в единицах оптической плотности.

1.6. Хроматографический анализ в тест-полосках

Хроматографический экспресс-анализ в тест-полосках (Bruning-Richardson et al., 2011a) разработан для помощи работающим в поле специалистам во время подозрения на вспышку чумы КРС. Выявление положительных результатов считается указанием на возможный случай чумы КРС и влечет за собой срочные меры по проведению дополнительных исследований. Саму тест-полоску отправляют в соответствующую Референтную лабораторию МЭБ вместе с другим патологическим материалом, так как из использованной тест-полоски можно извлечь нуклеиновую кислоту вируса для его характеристики (Bruning-Richardson et al., 2011b).

2. Серологические тесты

2.1. Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ

Существует конкурентный ИФА для обнаружения антител к вирусу чумы КРС в сыворотке животных любых видов, ранее зараженных вирусом. В основе теста лежит способность положительной исследуемой сыворотки конкурировать с моноклональным антителом к белку Н вируса чумы КРС за связывание с антигеном вируса чумы КРС. Присутствие таких антител в исследуемом образце будет блокировать связывание моноклонального антитела, продуцируя снижение ожидаемой реакции окрашивания после добавления меченого ферментом антимишиного IgG конъюгата и раствора субстрата/хромогена. Поскольку данный анализ является твердофазным, для удаления несвязанных реагентов, необходимы этапы промывки.

Антиген вируса чумы КРС получают из культур клеток почек теленка Madin-Darby, инфицированных аттенуированным штаммом Kabete «О» вируса чумы КРС и инактивированных нагреванием до 56°C в течение 2 часов. Антиген вируса экстрагируют из инфицированных клеток посредством многократных циклов обработки ультразвуком и центрифугирования. Моноклональные антитела получают посредством слияния спленоцитов гипериммунизированных мышей с линией клеток миеломы NSO с последующей демонстрацией их специфичности для белка Н вируса чумы КРС (Anderson et al., 1991); в настоящее время эти моноклональные антитела обозначают как С1. И антитела С1, и стандартизированный антиген вируса чумы КРС можно получить из Справочной лаборатории МЭБ по чуме КРС в Великобритании (см. Таблицу, представленную в Части 4 данного *Руководства для наземных животных*). Наборы есть в продаже.

2.1.1. Процедура теста

- i) Лиофилизированный антиген вируса чумы КРС восстанавливают с помощью 1 мл стерильной воды и разводят до рекомендованного производителем рабочего разведения, используя 0,01 М фосфатно-буферный раствор, pH 7,4.
- ii) Сразу после этого разведенный антиген в объемах по 50 мкл распределяют по соответствующему количеству лунок на плоскодонном микропланшете для ИФА, обеспечивающем высокий уровень связывания белка, выделяя по две лунки для каждой исследуемой сыворотки. Чтобы равномерно распределить антиген по дну каждой лунки, нужно слегка постучать по бокам микропланшета, затем запечатать его и инкубировать на шейкере с орбитальным вращением в течение 1 часа при 37°C. Лунки промывают три раза 0,002 М фосфатно-буферным раствором, pH 7,4.
- iii) В каждую тест-лунку вносят 40 мкл блокирующего буфера (0,01 М ФБР, 0,1% (в объемном отношении) Tween 20 и 0,3% (в объемном отношении) нормальной бычьей сыворотки), а затем вносят все исследуемые сыворотки в объемах по 10 мкл.
- iv) Рабочее разведение моноклонального антитела в блокирующем буфере готовят в соответствии с рекомендациями производителя и вносят по 50 мкл разведенного моноклонального антитела в каждую тест-лунку. Планшеты запечатывают и снова инкубируют на шейкере с орбитальным вращением в течение 1 часа при 37°C.
- v) Рабочее разведение кроличьего антимышиного иммуноглобулина, конъюгированного с пероксидазой хрена, в блокирующем буфере готовят в соответствии с рекомендациями производителя и вносят по 50 мкл иммуноглобулина в каждую тест-лунку. Планшеты запечатывают и снова инкубируют на шейкере с орбитальным вращением в течение 1 часа при 37°C.
- vi) В конце этого этапа планшеты промывают, как указано выше, и сразу снова наполняют смесью субстрата и хромогена в объемах по 50 мкл (1 часть 3% H₂O₂ к 250 частям орто-фенилендиамина) и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут без встряхивания. Затем вносят 50 мкл стоп-раствора, состоящего из 1 М серной кислоты.
- vii) Данная тест-система должна включать положительные и отрицательные сыворотки, контроль для моноклонального антитела и контроль для конъюгата.
- viii) Полученные показатели оптической плотности измеряют на ИФА-ридере с интерференционным фильтром 492 нм и переводят в значения процента ингибирования в сравнении со значением, полученным при использовании контроля для моноклонального антитела. Значения процента ингибирования 50% и более указывают на положительный результат теста, значения ниже 50% - на отрицательный.

Снижение порога разграничения положительного/отрицательного результата до 40% и ниже повышает чувствительность теста, но негативно отражается на специфичности ввиду увеличения доли ложноположительных результатов теста. На практике, значение 50% рекомендовано GREP, при этом чувствительность теста составляет не менее 70%, а специфичность – более 99%. Чувствительность

следует учитывать при разработке планов отбора проб для серологического надзора.

2.2. Нейтрализация вируса

Золотой стандарт исследования – реакцию нейтрализации вируса – проводят на культурах первичных клеток почки телят в роллерных пробирках методом Plowright & Ferris (1961); тест валидирован на экспериментально инфицированном КРС. В ходе процедуры, осуществляемой в роллерных пробирках, неинaktivированные сыворотки разводят в интервалах от 1 до 10, затем, начиная с неразведенной сыворотки, смешивают с равным объемом аттенуированного вакцинного вируса штамм Kabete «О» в дозе $10^{3,0}$ ТЦД₅₀/мл. Смеси инкубируют в течение ночи при 4°C, затем в каждую из пяти роллерных пробирок вносят по 0,2 мл, с последующим немедленным введением 1 мл диспергированных индикаторных клеток, суспендированных в ростовой среде в соотношении 2×10^5 клеток/мл. Пробирки инкубируют при 37°C в течение первых трех дней в наклонном положении, затем повторно наполняют поддерживающей средой и помещают в роллер. Пробирки регулярно исследуют на наличие вирус-специфического цитопатогенного действия, положительные пробирки учитывают и убирают; окончательный учет результатов проводят на 10 день.

Для подсчета конечных показателей доза вируса считается достаточной, если конечное разведение находится в диапазоне от $10^{1,8}$ до $10^{2,8}$ ТЦД₅₀/пробирку. Данный тест следует использовать для исследования сывороток от животных с положительной реакцией в ИФА в ходе национальных программ по серологическому надзору, проводимых с целью демонстрации свободы от инфекции или с целью отбора восприимчивого КРС для испытаний вакцины. В данных обстоятельствах считается, что присутствие любого количества обнаруживаемых антител в $\frac{1}{2}$ конечного разведения сыворотки указывает на перенесенную инфекцию вирусом чумы КРС. Реакция нейтрализация вируса – является методом выбора при исследовании образцов сыворотки от диких животных.

В качестве скрининг-теста применяют метод с использованием микропланшетов. Для этого теста первоначальное разведение сыворотки (1/5) дополнительно разводят с двукратными интервалами. Затем сыворотку в объемах по 50 мкл инкубируют с вирусом в объемах по 50 мкл, разведенным таким образом, чтобы ТЦД₅₀ разведения составлял от $10^{1,8}$ до $10^{2,8}$ (Taylor & Rowe, 1984). После инкубирования в течение 45 минут или в течение ночи вносят от 1 до 2×10^5 клеток почки телят, клеток почки ягненка или Vero клеток в качестве индикаторов. Реакцию останавливают через 6-7 дней. При высоких концентрациях сыворотки в таких тестах может возникать неспецифическая нейтрализация. По-видимому, в некоторых сыворотках от здоровых животных (без перенесенной инфекции чумы КРС) могут присутствовать факторы, которые обуславливают неспособность вируса проникать и реплицироваться в индикаторных клетках. В ходе реакции в пробирках влияние данных факторов, вероятно, нивелируется во время смены поддерживающей среды; при проведении теста на микропланшетах данные факторы присутствуют в течение всего периода исследования. Если наивысшая концентрация конечного разведения сыворотки не превышает 1/10, то данный эффект исчезает.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

1. Общая информация

1.1. Обоснование и предполагаемое назначение препарата

Живая аттенуированная культуральная вакцина против чумы КРС, описанная в предыдущих изданиях *Руководства по наземным животным* (Plowright, 1962), была разработана в Кении в результате серийных пассажей выделенного в 1911 г. полевого штамма вируса чумы КРС (RВOK (старый штамм чумы КРС Kabete или “Kabete “O”) в первичных клетках почки теленка. Хотя современная классификация вирусов чумы КРС по четырем линиям (африканские линии 1 и 2 и старая африканская линия 1, включавшая Kabete O, плюс азиатская линия) была неизвестна до 1995 года, с момента разработки вакцины RВOK посевной материал вакцины разошелся по всему миру, и миллионы доз вакцины применялись на полуострове Индостан, на Среднем и Ближнем Востоке, а также в Африке для борьбы с чумой КРС и ее искоренения.

Другие существующие в настоящее время вакцинные штаммы – LA (Nakamura & Miyamoto, 1953) и LA-АКО (Furutani et al., 1957a) – появились из разработанного лапинизированного вакцинного штамма Nakamura III (по-другому – L штамм; Nakamura et al., 1938) в результате многократных пассажей в клетках эмбрионов кур и кроликов. Исходный штамм Nakamura III широко применялся для контроля заболевания в Восточной и Юго-Восточной Азии. Штаммы LA и LA-АКО обладают намного более низкой вирулентностью, чем исходный штамм, особенно, для высоко восприимчивых пород КРС в Восточной Азии, таких японская черная и корейская желтая. В настоящее время штамм LA-АКО используют для производства культуральной вакцины против чумы КРС для целей вынужденной вакцинации на одобренном МЭБ/ФАО предприятии, обеспечивающем соответствующий уровень биологической защиты и безопасности.

2. Описание процесса производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

i) RВOK

Посевной материал, используемый в производстве живой аттенуированной культуральной вакцины против чумы КРС, должен обеспечивать производство безопасной клеточной культуральной вакцины, индуцирующей у КРС иммунитет продолжительностью не менее пяти лет. Иммуногенность посевного материала продемонстрирована вплоть до 122-го пассажа в клетках почки теленка, дальнейшее пассирование не рекомендуется.

Поддержание вакцинного штамма осуществляется в системах посевного материала между пассажами 90-го и 120-го уровня. Посевной вирус хранят в лиофилизированном виде при температуре -20°C и ниже. Вирус культивируют в клетках Vero или в первичных или серийно культивированных клетках почки, полученных от здорового плода теленка или очень молодого теленка. Серийно культивированные клетки

должны быть получены не позднее, чем после десяти пассажей исходной культуры.

Посевной вирус позволяет получить вакцину, безопасную для применения у различных европейских, африканских и индийских пород КРС. Оценку безопасности и эффективности вакцины у китайских и японских пород КРС не проводили.

ii) LA-АКО

Посевной вирус (LA-АКО) получен из штамма Nakamura III (на уровне 897-ого пассажа в клетках кролика) в результате многократных пассажей в клетках эмбрионов кроликов (29 пассажей) и в клетках куриных эмбрионов (456 пассажей). Введение вируса LA-АКО не вызывает клинических признаков кроме небольшого повышения температуры тела у высоко восприимчивых пород, таких как японская черная. Следует отметить, однако, что вирус вызывает выраженную спленомегалию у куриных эмбрионов (Furutani et al., 1957b). Недавно последовательность генома LA-АКО и его родительского штамма, Nakamura III, были зарегистрированы в публичных базах данных (Fukai et al., 2011; Takamatsu et al., 2015).

Посевной материал лиофилизируют и хранят при температуре -20°C или ниже.

2.1.2. Критерии качества

i) РВОК и LA-АКО

Необходимо подтвердить, что посевной материал как РВОК, так и LA-АКО является:

а) Чистым

То есть свободным от контаминации вирусами, бактериями, грибами или микоплазмами.

б) Безопасным

То есть не вызывающим клинической реакции при введении КРС, восприимчивому к чуме КРС.

с) Эффективным

То есть индуцирующим иммунитет к чуме КРС у КРС, восприимчивому к данному заболеванию.

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

i) РВОК

Отдельные серии вакцины производят посредством заражения клеточных культур с последующим – после соответствующего периода инкубирования – сбором покрывающей среды, в которой в больших количествах присутствуют высвобожденные частицы живого вируса. Вирус можно выращивать в первичных культурах клеток почки эмбрионов КРС или телят или в гомогенатах клеток, полученных в результате не менее чем десяти пересевов одной из вышеуказанных культур. Кроме того, вакцину можно производить в утвержденных перевиваемых клеточных культурах при условии, что клетки не инфицированы случайно занесенными вирусами, включая вирус вирусной диареи КРС, и поддерживаются в системе посевных материалов.

Вирусный материал собирают с культур, инкубируемых в роллерных флаконах, не позднее чем через 10 дней после их инфицирования. Правильный момент для сбора вирусного материала определяют по наличию обширного характерного ЦПЭ внутри клеточного монослоя. Для формирования промышленной суспензии собранный вирусный материал очищают центрифугированием на низкой скорости, а затем вносят криопротектор.

Из одного и того же набора культур разрешается произвести два сбора, которые можно объединить для образования одной суспензии. Все этапы производства вакцины должны быть описаны в соответствующем протоколе.

ii) LA-AKO

Отдельные серии вакцины производят путем заражения клеток Vero восстановленным посевным материалом с последующим сбором покрывающей среды и инфицированных клеток, содержащих большое количество частиц живого вируса, после инкубирования в течение соответствующего периода времени. Серию вакцины также можно произвести из промышленной суспензии, содержащей вирус в соответствующей концентрации, поддерживаемой за счет нескольких серийных пересевов (до 10 раз). Кроме того, производство вакцины следует осуществлять в стерильных условиях в культуре, свободной от таких случайно занесенных агентов, как вирус вирусной диареи КРС, вирус лейкоза КРС и ротавирус КРС.

Вирусный материал собирают с культур, инкубируемых в роллерных флаконах, не позднее чем через 7 дней после их заражения. Правильный момент для сбора вирусного материала определяют по наличию обширного характерного ЦПЭ внутри клеточного монослоя. Для формирования промышленной суспензии собранный вирусный материал очищают центрифугированием на низкой скорости, а затем вносят криопротектор.

Все этапы производства вакцины должны быть описаны в соответствующем протоколе.

Для длительного хранения и реализации в режиме холодной цепи промышленные суспензии лиофилизируют.

2.2.2. Требования к субстратам и средам

i) RВОК

а) Клетки

Первичные клетки, серийно культивированные первичные клетки или перевиваемые клеточные культуры получают от здоровых на вид животных или из нормальных эмбрионов, при этом все клеточные культуры должны сохранять нормальную морфологию во время культивирования. Клетки должны быть свободны от контаминации случайно занесенными вирусами, особенно, вирусом вирусной диареи КРС (см. ниже).

б) Среда

Клетки почки теленка выращивают и поддерживают в сбалансированном солевом растворе Эрла или в минимальной эссенциальной среде Игла с добавлением 0,5% гидролизата лактальбумина и 0,1% экстракта дрожжей, а также 5% сыворотки новорожденного теленка КРС, восприимчивого к чуме КРС, из стран с незначительным риском губкообразной энцефалопатии КРС.

Клетки Vero выращивают и поддерживают в среде Игла в модификации Глазго с добавлением 14% ТРВ и 6% сыворотки КРС (свободной от антител к вирусу чумы КРС), не подвергавшейся тепловой обработке, а также антибиотиков.

с) Криопротектор

В качестве стабилизатора для лиофилизации используют раствор, содержащий равные объемы 5% гидролизата лактальбумина и 10% сахарозы.

ii) LA-АКО

а) Клетки

Во время культивирования перевиваемые культуры клеток Vero должны сохранять нормальную морфологию. Клетки должны быть свободны от контаминации случайно занесенными вирусами.

б) Среда

Клетки Vero выращивают и поддерживают в минимальной эссенциальной среде Игла с добавлением 10% нагретой фетальной телячьей сыворотки, 0,295% ТРВ, а также антибиотиков.

д) Криопротектант

В качестве стабилизатора для лиофилизации используют раствор, содержащий равные объемы 1% глутамата натрия, 0,3% поливинилпирролидона и 10% сахарозы.

2.2.3. Контроль в процессе производства

i) РВОК

Титрацию вируса проводят на посевном материале путем десятикратных разведений вируса на микропланшетах или в роллерных пробирках с использованием десяти репликаторов на одно разведение.

Перед лиофилизацией готовый нефасованный продукт можно хранить при 4°C не более 5 дней, а в случае замораживания при температуре от –20°C до –60°C – в течение значительно более длительного периода времени.

Исследования на наличие контаминации случайно занесенными вирусами проводят на двух неинфицированных контрольных клеточных культурах, приготовленных из клеточных суспензий, используемых для производства серии, после выдерживания их в той же среде и инкубирования в тех же условиях, что и культуры, зараженные вирусом чумы КРС. В процессе производства контрольные культуры регулярно изучают под микроскопом, и результаты таких исследований должны быть отрицательными. После сбора вируса контрольные культуры промывают с целью удаления бычьей сыворотки и повторно инкубируют в течение 10 дней в среде, содержащей заменители бычьей сыворотки, с регулярным исследованием под микроскопом на предмет наличия цитопатогенных изменений. По завершении этого периода одну из культур исследуют на присутствие нецитопатогенного вируса вирусной диареи КРС методом иммунофлуоресценции, иммунопероксидазным методом или методом ОТ-ПЦР.

Иммуногенность готового нефасованного продукта определяют путем титрации, как и в случае с посевным вирусом.

ii) LA-АКО

Титрацию вируса проводят на каждой серии готовой промышленной суспензии путем десятикратных разведений вируса на микропланшетах или в роллерных пробирках с использованием четырех репликаторов на одно разведение.

С целью обеспечения титра и свойств готовой промышленной суспензии проводят маркерный тест. LA-АКО индуцирует выраженную спленомегалию у зараженных куриных эмбрионов. 15 мкл десятикратного и стократного разведения образца готовой промышленной суспензии вводят в кровяной сосуд куриного яйца (для теста используют более 10 штук яиц) на 11 или 12 день кладки. Яйца инкубируют при температуре 38°C в течение 5 дней. Селезенки куриных эмбрионов, оставшихся живыми после заражения, собирают и взвешивают. Селезенки должны стать тяжелее на 15 мг.

Исследования на наличие контаминации случайно занесенными вирусами проводят на не менее чем 1% неинфицированных контрольных клеточных культур, приготовленных из клеточных суспензий, используемых для производства промышленной суспензии, после выдерживания их в той же среде и инкубирования в тех же

условиях, что и культуры, зараженные вирусом чумы КРС. В процессе производства контрольные культуры регулярно изучают под микроскопом, и результаты таких исследований должны быть отрицательными. В день сбора вирусного материала контрольные культуры изучают под микроскопом на предмет наличия гемадсорбции. Культуры, не инфицированные вирусом чумы КРС, промывают для удаления фетальной телячьей сыворотки и делят на две группы. Каждую группу покрывают 0,1% суспензией эритроцитов морских свинок или гусей на 1 час, затем просматривают под микроскопом. В контрольных культурах не должно наблюдаться абсорбции эритроцитов этих видов.

Каждую серию готовой промышленной суспензии также изучают на наличие вирусной контаминации в *in vitro* и *in vivo* тестах. Для анализов *in vitro* образцы готовой промышленной суспензии смешивают с кроличьей антисывороткой с титром антител, нейтрализующим вирус чумы КРС, вносят в перевиваемые культуры почек и семенников теленка и инкубируют при 37°C в течение 7 дней. Во время инкубирования в культуре клеток не должен возникать цитопатогенный эффект. Те же образцы также вносят в культуру клеток почки эмбрионов африканской мартышки, МА-104, которая считается высоко восприимчивой к ротавирусу обезьян (Smith et al., 1979). В зараженных культурах МА-104 цитопатогенный эффект должен отсутствовать. Для анализа *in vivo* образец готовой промышленной суспензии в объеме 10 мл смешивают с кроличьей антисывороткой с титром антител, нейтрализующим вирус чумы КРС, и вводят внутримышечно овце, восприимчивой к вирусу лейкоза КРС. Сыворотки, полученные от овцы через 2 и 3 месяца после заражения, исследуют на присутствие антител к вирусу лейкоза КРС в реакции иммунодиффузии в агаровом геле.

Готовую промышленную суспензию смешивают с криопротектантом и расфасовывают по флаконам в день лиофилизации. До добавления криопротектанта хранение готовой промышленной суспензии в течение более длительного периода времени возможно в случае ее замораживания при температуре -20°C или ниже.

2.2.4. Испытания серии готового продукта

i) РВОК

а) Стерильность и чистота

Испытания биологического материала на стерильность и отсутствие контаминации описаны в Главе 1.1.9.

Серия готового продукта состоит из флаконов с лиофилизированным препаратом, произведенным из вирусного материала, полученного в результате одного сбора; одна серия может включать несколько расфасованных партий. Содержимое одного контейнера из каждой расфасованной партии нейтрализуют с использованием кроличьей антисыворотки против чумы КРС путем смешивания разных разведений вируса с неразведенной противовирусной сывороткой, а затем вносят в культуры клеток почек теленка. Подлинность препарата считается подтвержденной при отсутствии ЦПЭ, специфичного для вируса чумы КРС.

б) Безопасность и эффективность

Животных, которых используют в данных испытаниях, следует содержать отдельно от других животных, восприимчивых к чуме КРС. По завершении испытания животных умерщвляют, а туши уничтожают с соблюдением мер безопасности. В случае использования КРС, восприимчивого к чуме КРС, содержимое пяти произвольно выбранных флаконов объединяют и вводят одной голове КРС в объеме, эквивалентном 100 полевым дозам для КРС (при этом полевой дозой считают дозу 300 ТЦД₅₀ и более), и трем головам КРС в объеме, эквивалентном однократной полевой дозе для КРС. В течение следующих 3 недель, животных содержат в тесном контакте с контактировавшими контрольными животными. В течение этого периода животным ежедневно проводят термометрию и регулярное клиническое обследование. В конце трехнедельного периода пробы от животных исследуют на присутствие нейтрализующих антител к чуме КРС в тесте на микропланшетах. Вакцина считается безопасной и эффективной, если она не индуцирует патологической клинической реакции, если у всех вакцинированных животных титр вирус-нейтрализующих антител составляет 1/10 или выше и если отсутствуют признаки передачи вакцинного вируса. Каждую партию вакцины также тестируют на безвредность на мелких животных.

В целом, безопасность вакцины RВОК подтверждена как у европейских, так и у индийских пород КРС, а также у карликовых западно-африканских пород скота. Вакцину не испытывали на японских или китайских породах скота, и ее безопасность у таких животных не подтверждена.

с) Иммуногенность серии

Тесная взаимосвязь между иммунизирующей активностью и инфекционностью позволяет использовать последнюю в качестве основы для оценки иммуногенности. Титр инфекционной активности определяют с использованием клеток утвержденной перевиваемой линии или клеток, выращенных из каждой из трех почек от разных телят или эмбрионов КРС. Для первой титрации можно использовать пул из пяти флаконов, использованных в тесте на безопасность. Вторую и третью оценки производят на дополнительных пулах, каждый из которых состоит из трех флаконов с готовым продуктом. Чувствительность клеток, используемых на каждом этапе работы, определяют с помощью стандартного лабораторного препарата вируса чумы КРС. Конечный титр представляет собой геометрическое среднее значение трех оценок, каждая из которых произведена с использованием десятикратных разведений и десяти наблюдений на одно разведение. Иммуногенная вакцина должна содержать 100 полевых доз на один флакон.

ii) LA-AKO

а) Стерильность и чистота

Испытания биологического материала на стерильность и отсутствие контаминации описаны в Главе 1.1.9.

Серия готового продукта состоит из флаконов с лиофилизированным препаратом, произведенным из вирусного материала, полученного в результате одного сбора. Содержимое одного контейнера нейтрализуют с использованием кроличьей антисыворотки против чумы КРС путем смешивания разных разведений вируса с неразведенной противовирусной сывороткой, а затем вносят в культуры клеток почек и семенников теленка. В зараженных культурах клеток ЦПЭ должен отсутствовать.

б) Безопасность и эффективность

Содержимое произвольно выбранного флакона вводят каждой из двух восприимчивых к чуме КРС коров породы японская черная в объеме, равном одной полевой дозе для КРС (полевая доза содержит 1000 и более ТЦД₅₀). В течение следующих 2 недель животных содержат в виварии с обеспечением всех мер биозащиты. Во время этого периода термометрию животных проводят ежедневно, а клинический осмотр – регулярно. Пробы сыворотки от животных, отобранные спустя достаточное количество времени после вакцинации, исследуют на присутствие нейтрализующих антител к вирусу чумы КРС в культурах клеток Vero. Вакцина считается безопасной и эффективной, если она не вызывает развития патологической клинической реакции за исключением небольшого повышения температуры тела, и если титр нейтрализующих антител в пробах сыворотки от обоих вакцинированных животных в десять раз выше.

с) Иммуногенность серии

Тесная взаимосвязь между иммунизирующей активностью и инфекционностью позволяет использовать последнюю в качестве основы для оценки иммуногенности. Титр инфекционной активности определяют с использованием того же метода, что и для готовой серии.

2.3. Требования для получения регистрационного удостоверения

2.3.1. Требования к безопасности

і) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

а) РВОК и LA-АКО

Вакцина РВОК не вызывает клинических признаков у КРС или азиатских буйволов, восприимчивых к чуме КРС, Вакцина LA-АКО также не индуцирует никаких клинических признаков за исключением небольшого повышения температуры тела у КРС, восприимчивого к чуме КРС. Ни одна из вакцин не передается КРС, восприимчивому к чуме КРС, через контакт с вакцинированными животными, содержащимися в непосредственной близости.

ii) Возврат к вирулентности

a) РВОК и LA-АКО

Вакцинный вирус РВОК остается аттенуированным после не менее чем пяти обратных пассажей в КРС и не распространяется через контакт между животными. При производстве культуральной вакцины против чумы КРС с использованием любого субштамма вакцины РВОК или LA-АКО необходимо обеспечить возможность отслеживания происхождения вакцинного штамма от одного из вышеуказанных субштаммов.

iii) Проблемы охраны окружающей среды

a) РВОК и LA-АКО

При производстве или применении вакцины против чумы КРС не возникает проблем, связанных с охраной окружающей среды.

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

a) РВОК и LA-АКО

Обе вакцины обеспечивают защиту вакцинированных животных от клинической формы заболевания, вызываемого заражением вирулентным вирусом чумы КРС.

ii) Для контроля и искоренения болезни

a) РВОК и LA-АКО

С целью искоренения болезни необходимо как можно скорее вакцинировать всех восприимчивых животных внутри зоны вспышки и вокруг нее (Taylor et al., 2002).

2.3.3. Стабильность

i) РВОК

Живая аттенуированная культуральная вакцина против чумы КРС при правильной лиофилизации обладает высокой стабильностью и может храниться в течение продолжительного периода времени при +4°C или при -20°C при условии, что в продукте сохраняется вакуум. Скорость деградации лиофилизированной вакцины может меняться в зависимости от выбранного стабилизатора и цикла сушки. Самые благоприятные результаты получали с использованием стабилизатора на основе 5% гидролизата лактальбумина/10% сахарозы, 72-74-часового цикла вакуумной сушки при более низком давлении (100 миллиторр): начальная сушка в течение 16 часов при -30°C и конечная температура на стеллаже 35°C. Учитывая высокий титр выпускаемой вакцины, её можно использовать в полевых условиях в течение 30 дней

без охлаждения. После восстановления в нормальном солевом растворе или в 1 М сульфате магния вирус становится более термолабильным. Период использования в полевых условиях восстановленной вакцины не должен превышать периода её полураспада, но поскольку данный параметр зависит от температуры и варьирует от 8 до 24 часов в диапазоне температур от 4°C до 37°C, предельный срок следует определять исходя из здравого смысла; обычно рекомендуется универсальный период продолжительностью до 4 часов.

ii) LA-АКО

Живая аттенуированная культуральная вакцина против чумы КРС при правильной лиофилизации обладает высокой стабильностью и может храниться в течение продолжительного периода времени при +4°C, или при –20°C при условии заполнения продукта газообразным азотом. Скорость деградации лиофилизированной вакцины может меняться в зависимости от выбранного стабилизатора и цикла сушки. Оптимальные результаты получали с использованием вышеупомянутого криопротектанта, 48-часового цикла вакуумной сушки при более низком давлении (10 Па и ниже), начальной сушки в течение 24 часов при –45°C с конечной температурой на стеллаже 22°C и при заполнении флаконов газообразным азотом. Учитывая, высокий титр выпускаемой вакцины, её можно использовать в полевых условиях в течение нескольких дней без охлаждения. После восстановления в ФБР вирус становится более термолабильным, поэтому восстановленную вакцину необходимо как можно быстрее передавать лицам, осуществляющим вакцинацию, с целью её немедленного проведения.

3. Биотехнологические вакцины

На данный момент среди утвержденных вакцин нет ни одной биотехнологической.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ANDERSON J., BARRETT T. & SCOTT G.R (1966). Manual on the Diagnosis of Rinderpest, Second Edition. FAO Animal Health Manual No.1. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 143 pp.

ANDERSON J., MCKAY J.A. & BUTCHER R.N. (1991). The use of monoclonal antibodies in competitive ELISA for the detection of antibodies to rinderpest and peste des petits ruminants. *In: The Seromonitoring of Rinderpest throughout Africa. Phase One. Proceedings of Final Research Co-ordination Meeting. Joint FAO/IAEA (Food and Agriculture Organisation of the United Nations/International Atomic Energy Agency) Division, Vienna, Austria, 43–53.*

BROWN C.C. (1997). A review of three pathology-based techniques for retrospective diagnosis of rinderpest, with comparison to virus isolation. *Res. Vet. Sci.*, **63**, 103–106.

BRUNING-RICHARDSON A., AKERBLOM L., KLINGEBORN B. & ANDERSON J. (2011). Improvement and development of rapid chromatographic strip-tests for the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *J. Virol. Methods*, **174**, 42–46.

- BRUNING-RICHARDSON A., BARRETT T., GARRATT J.C. & ANDERSON, J. (2011). The detection of rinderpest virus RNA extracted from a rapid chromatographic strip-test by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, **173**, 394–398.
- FERNANDEZ P. & WHITE W. (2010). Atlas Of Transboundary Animal Diseases. OIE, Paris.
- FOREMAN A.J., ROWE L.W. & TAYLOR W.P. (1983). The detection of rinderpest antigen by agar gel diffusion and counterimmunoelectrophoresis. *Trop. Anim. Health Prod.*, **15**, 83–85.
- FORSYTH M.A. & BARRETT T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.*, **39**, 151–163.
- FUKAI K., MORIOKA K., SAKAMOTO K. & YOSHIDA K. (2011). Characterization of the complete genomic sequence of the rinderpest virus Fusan strain cattle type, which is the most classical isolate in Asia and comparison with its lapinized strain. *Virus Genes*, **43**, 249–253.
- FURUTANI T., KATAOKA T., KURATA K. & NAKAMURA H. (1957a). Studies on the AKO strain of lapinized-avianized rinderpest virus. I. Avianization of lapinized rinderpest virus. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health*. **32**, 117–135. (Abstract in English.)
- FURUTANI T., ISHII S., KURATA K. & NAKAMURA H. (1957b). Studies on the AKO strain of lapinized-avianized rinderpest virus. II. Features of multiplication of the virus in embryonating hen eggs. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health*. **32**, 136–149. (Abstract in English.)
- KOCK R.A. (2006). Rinderpest and wildlife. *In: Rinderpest and Peste des Petits Ruminants, Virus Plagues of Large and Small Ruminants*, Barrett T., Pastoret P.-P. & Taylor W.P., eds. Academic Press, Oxford, UK, 143–162.
- LIBEAU G., DIALLO A., COLAS F. & GUERRE L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, **134**, 300–304.
- NAKAMURA J., AGATSUMA S. & FUKUSHO K. (1938). Rinderpest virus infection in rabbits I: Basic investigation. *Jpn J. Vet. Med. Sci.*, **17**, 185–204. (In Japanese only.)
- NAKAMURA J. & MIYAMOTO T. (1953). Avianization of lapinized rinderpest virus. *Am. J. Vet. Res.*, **14**, 307–317.
- PLOWRIGHT W. (1962). The application of monolayer tissue culture techniques in rinderpest research. II. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. *Bull. Off. int. Epiz.*, **57**, 253–276.
- PLOWRIGHT W. & FERRIS R.D. (1961). Studies with rinderpest virus in cell culture. III. The stability of cultured virus and its use in neutralisation tests. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **11**, 516–533.
- ROEDER P.L. & RICH K. (2009). Rinderpest Eradication in Millions Fed: Successes in Agriculture, Spielman D. & Pandya-Lorch R., eds. International Food Policy Research Institute, Washington, DC 20006-1002 USA; Chapter 16, 109–116.
- SMITH E.M., ESTES M.K., GRAHAM DY. & GERBA C.P. (1979). A plaque assay for the simian rotavirus SA11. *J. Gen. Virol.* **43**, 513–519.

TAKAMATSU H., TERUI K. & KOKUHO T. (2015). Complete genome sequence of Japanese vaccine strain LA-AKO of rinderpest virus. *Genome Announc.*, doi: 10.1128/genomeA.00976-15.

TAYLOR W.P & BARRETT T. (2007). Peste des Petits Ruminants and Rinderpest in Diseases of Sheep, Fourth Edition, Aitken I.D., ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

TAYLOR W.P., ROEDER P.L., RWEYEMAMU M.M., MELEWAS J.N., MAJUVA P., KIMARO R.T., MOLLEL J.N., MTEI B.J., WAMBURA P., ANDERSON J., ROSSITER P.B., KOCK R., MELENGEYA T. & VAN DEN ENDE R. (2002). The control of rinderpest in Tanzania between 1997 and 1998. *Trop. Anim. Health Prod.*, **34**, 471–487.

TAYLOR W.P. & ROWE L.W. (1984). A microneutralisation test for the detection of rinderpest virus antibodies. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **37**, 155–159.

WAMWAYI H.M., FLEMING M. & BARRETT T. (1995). Characterisation of African isolates of rinderpest virus. *Vet. Microbiol.*, **44**, 151–163.

NB: Существуют референтные лаборатории МЭБ по чуме КРС
(см. Таблицу в Части 4 данного Руководства по наземным животным или обновленный
список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> <http://www.oie.int/>)

Дополнительную информацию по диагностическим тестам, реактивам и вакцинам против чумы КРС можно получить в референтных лабораториях МЭБ