*Проект*

*Изображение государственного Герба Республики Казахстан*

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КУ-ЛИХОРАДКИ**

**Основные положения**

**СТ РК**

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения*

**Комитет технического регулирования и метрологии**

**Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан**

**(Госстандарт)**

**Астана**

**Предисловие**

**1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ №\_\_\_\_\_

**3** Настоящий стандарт разработан с учетом требований Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, ВОЗЖ, Глава 3.1.17

**4** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан «О ветеринарии» от 10 июля 2002 года № 339

**5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге национальных стандартов и национальных классификаторов технико-экономической информации Республики Казахстан, а текст изменений и поправок – в периодических информационных указателях стандартов. В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в периодическом информационном указателе стандартов*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Содержание**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1  2  3  4  5  6  7  8 | Введение  Область применения  Нормативные ссылки  Обозначения и сокращения  Общие положения  Диагностические технологии  Идентификация возбудителя  Серологические тесты  Требования к вакцинам |  |

**Введение**

1. **Определение болезни и способы ее передачи**

Ку-лихорадка (коксиеллез) широко распространена по всему миру за исключением Новой Зеландии. Возбудитель *Coxiella burnetii* присутствует во всех животных царствах, включая членистоногих, но болезнь поражает в основном людей, КРС, овец и коз. Домашних жвачных считают основным резервуаром *Coxiella burnetii*, но и кошки, собаки, кролики и птицы и пр. участвуют в заражении человека. Инфекция в основном распространяется при вдыхании сухих аэрозольных частиц и при близком контакте с зараженными животными, с их тканями репродуктивной системы или другими продуктами животного происхождения, например, шерсти. Ку-лихорадка редко передается от человека к человеку, но возможно заражение во время родов, при половом контакте или переливании крови. У животных можно наблюдать вертикальную передачу вируса и заражение при половом контакте, но актуальность этих путей передачи неизвестна. В передаче ку-лихорадки могут участвовать членистоногие, в основном клещи. Передача может быть вызвана укусами и контактами с контаминированными частицами пыли от высохших экскрементов.

1. **Описание патогена-возбудителя**

Этиологический агент, *Coxiella burnetii,* является грам-отрицательной, облигатной внутриклеточной бактерией, приспособившейся к выживанию в фаголизосоме фагоцита. Исторически возбудитель был отнесен к семейству *Rickettesiaceae.* Филогенетические исследования, основанные большей частью на анализе последовательностей генов 16S рРНК, показали, что род *Coxiella* далек от рода *Rickettesia,* отнесенного к альфа-подразделению протеобактерий. *Coxiella burnetii* отнесли к семейству Coxiellaceae, отряду Legionellales подразделения гамма протеобактерий. Проведенное полное секвенирование генома *Coxiella burnetii*, подтвердило положение возбудителя в системе. Геномы изолятов *Coxiella burnetii* из широкого спектра биологически и географически разнообразных источников отличаются высокой консервативностью, а заметный полиморфизм проявляется в виде перестановки блоков синтении. Данная геномная пластичность может стать причиной различных фенотипов и представляет особый интерес для методов генотипирования. В отличие от риккетсии *Coxiella burnetii* образует небольшую, плотную, высокоустойчивую споро-подобную форму. Данная способность объясняется существованием вариантов цикла развития *Coxiella burnetii*, описанных в исследованиях in-vitro: крупноклеточные варианты (LCV), мелкоклеточные варианты (SCV) и низкоплотные клетки (SDC) шириной 0,2 мкм, длиной 0,5 – 2 мкм, или диаметром 0,4 – 0,7 мкм. SDC и SCV представляют собой небольшие морфологические варианты бактерий, которые с большой долей вероятности способны выживать вне клеток в виде инфекционных частиц, данная черта важна для выживания в окружающей среде и дальнейшей передачи.

Отличительной чертой *Coxiella burnetii* является наличие двух антигенных форм: патогенная фаза I, выделенная у зараженных животных или людей, и аттенуированная фаза II, полученная при повторных *in-ovo и in-vitro* пассажах. Во время серийных пассажей отмечают изменение липополисахаридов (ЛСП): клетки первой фазы с полноразмерными О-цепями ЛСП, изменяются в промежуточные фазы с сокращающейся длиной О-цепи ЛСП и затем в фазу II с сокращенными ЛСП. Длинная фаза I ЛСП содержит часть фазы II. Вторая фаза – ключевой иммуногенный детерминант.

1. **Описание болезни у людей**

Ку-лихорадка является зоонозом. У людей инфекция проявляется в острой, клинической и субклинической форме. Диагностика и лечение часто запаздывают из-за различных и неспецифических клинических проявлений. Острые формы могут ограничиться симптоматикой гриппа, а могут проявляться как пневмония или гранулематозный гепатит, требующие госпитализации. Хроническая форма ку-лихорадки в основном характеризуется эндокардитом, вальвулярными, васкулярными или аневризматическими инфекциями, гепатитом, пневмонией или синдромом хронической усталости. Острая форма проходит довольно быстро после надлежащего лечения антибиотиками, а хроническая форма требует длительного лечения антибиотиками (в течение двух или более лет), в сочетании с серологическим мониторингом. При отсутствии надлежащего лечения антибиотиками осложнения, вызванные хронической формой, могут быть тяжелыми и даже смертельными. Заражение беременных женщин *Coxiella burnetii* может спровоцировать воспаление плаценты и привести к преждевременным родам, ограничениям в росте, спонтанным выкидышам или гибели плода. В целом, хроническая болезнь с большей долей вероятности поражает тех, кто находится в группе повышенного риска (например, ослабленный иммунитет или вальвулопатия). Данная инфекция эндемична для многих регионов, вызывая спорадические случаи заболевания или стремительные эпидемии. Инцидентность заболевания, вероятно, выше, чем заявлена. Ку-лихорадка поражает людей всех возрастов, но чаще всего регистрируется у людей в возрасте от 30 – 60 лет.

1. **Описание болезни у животных**

У коров, овец и коз ку-лихорадка в основном связана с выкидышами на поздних сроках, проблемами с репродуктивной системой, такими как преждевременные роды, мертворожденное или слабое потомство. *Coxiella burnetii* может быть связана с метритом и бесплодием у КРС. Учитывая недостаточную специфичность последних симптомов, не рекомендуется полагаться на них для проведения клинической диагностики ку-лихорадки. Домашние жвачные являются основными субклиническими переносчиками, но они могут выделять бактерии во внешнюю среду с различными секретами и экскретами. Во внешней среде *Coxiella burnetii* может выживать в течение разных периодов времени, когда она и распространяется. Уровни бактериальной контаминации во внешней среде можно снизить, используя количественную ПЦР (полимеразная цепная реакция) для выявления ДНК *Coxiella burnetii,* но необходим экспресс-тест для оценки жизнеспособности возбудителя, позволяющий оценить риск распространения инфекции в окружающей среде. Недостаток знаний о способах выделения вируса в окружающую среду среди жвачных затрудняет определение статуса ку-лихорадки. Довольно редки случаи выделения возбудителя с молоком, фекалиями и вагинальным секретом. С наибольшей вероятностью вирус выделяться с вагинальным секретом в момент ягнения. В стадах, где отмечены случаи выкидышей, вызванных *Coxiella burnetii,* большая часть животных может выделять большие объемы бактерий, независимо от того был выкидыш или нет. Суммарные количества заметно выше, чем в стадах с субклинической формой инфекции. Во время родов, зарегистрированных после всплеска числа выкидышей, рожающие самки выделяли больше бактерий в окружающую среду по сравнению с другими самками. Кроме того, выделение возбудителя в окружающую среду может продолжаться в течение нескольких месяцев, либо с перерывами, либо непрерывно. Наиболее интенсивно выделяют вирус те животные, у которых наблюдают непрерывную модель выделения. Эти животные в большей степени демонстрируют высоко сероположительный серологический профиль. Выделение и серологический ответ связаны на уровне группы, а не на уровне отдельных особей.

1. **Дифференциальная диагностика у жвачных**

Диагноз ку-лихорадка у жвачных, включая его дифференциацию от прочих других причин выкидышей, традиционно ставят на основе микроскопических исследований клинических образцов в сочетании с положительными серологическими результатами. Отсутствует общепринятая методика (золотой стандарт), но в качестве метода выбора для клинической диагностики можно воспользоваться ПЦР и серологическим вариантом ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ) для непосредственного качественного и количественного обнаружения. Был выдвинут ряд предложений о разработке гармонизированных схем мониторинга и отчетности по ку- лихорадке, которые позволили бы проводить сравнительный анализ во времени и между странами. Для стад с подозрением на наличие болезни и стад, подвергающихся риску заражения, или при обмене между стадами необходимо применять диагностические тесты на ку-лихорадку в рамках эпизоотологических наблюдений (по итогам недавних вспышек среди людей или животных). Таким образом, всячески поощряется валидация методов, применяемых для указанных целей (см. таблицу 1), и для разработки эталонных материалов для контроля качества, повышения квалификации и гармонизации.

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КУ-ЛИХОРАДКИ**

**Основные положения**

**Дата введения**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной диагностики ку-лихорадки у животных.

Ку-лихорадка (или коксиеллез) является зоонозом, который регистрируют во многих странах. Людям болезнь обычно передается воздушным путем от животных, являющихся носителями инфекции (домашние жвачные, другие домашние и дикие животные и птицы). Возбудителем заболевания является облигатная интрацеллюлярная бактерия Coxiella burnetii, демонстрирующая различные морфологические формы в ходе своего цикла развития. Некоторые формы могут выживать вне клетки и аккумулироваться в условиях внешней среды. Все манипуляции с потенциально зараженным и контаминированным материалом следует проводить в надлежащих условиях биобезопасности и с соблюдением мер предосторожности, определенных по результатам анализа биологического риска.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте нормативные ссылки отсутствуют.

**3 Обозначения и сокращения**

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения

+++ - рекомендованный метод;

++ - рекомендован, но имеет ограничения;

+ - подходит в очень ограниченных обстоятельствах;

– - не подходит для данной цели;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

ИФА - твердофазный иммуноферментный анализ;

РНИФ - реакция непрямой иммунофлюоресценции;

РСК - реакция связывания комплемента.

**4 Общие положения**

**4.1 Описание болезни**

У людей болезнь отличается большим полиморфизмом. Ку-лихорадка проявляется либо в острой форме или затяжной хронической форме, развивающейся в результате более раннего заражения, может при этом протекать незаметно. Острая форма довольно быстро проходит после надлежащего лечения антибиотиками, а хроническая требует продолжительного лечения антибиотиками (от двух лет и более) и сопутствующего серологического мониторинга.

*Проект, редакция 1*

У домашних жвачных ку-лихорадка в основном вызывает спорадические аборты или вспышки абортов, приводит к мертворождениям и появлению слабого потомства, затем следует период выздоровления без осложнений. Ку-лихорадка связана с бесплодием или метритом у КРС. Инфекция Coxiella burnetii персистирует в течение нескольких лет, и, вероятно, на протяжении всей жизни. Овцы, козы и коровы являются в основном субклиническими переносчиками, но могут выделять в среду бактерии через различные секреты и выделения.

**4.2 Идентификация возбудителя**

Для лабораторной диагностики в случае серийных абортов и/или мертворождений можно брать пробы плаценты, вагинальных выделений и ткани от абортированного плода (селезенки, печени, легких или содержимого желудка). Для исследования случаев выделения бактериального материала во внешнюю среду, можно брать пробы вагинальных выделений, пробы молока и молозива.

Учитывая, что Coxiella burnetii является облигатной интрацеллюлярной бактерией, ее можно выделить путем прививания образцов в традиционные клеточные культуры, в желточный мешок куриного эмбриона или лабораторным животным. Прививание лабораторным животным (морским свинкам, мышам, хомякам) целесообразно в случаях выделения возбудителя из тканей, фекалий, молока или проб с предметов окружающей среды, контаминированных различными микроорганизмами.

Бактерии можно рассмотреть в образцах окрашенной ткани или вагинальных мазках с использованием микроскопа с масляно-иммерсионными линзами объектива. Поскольку он является устойчивым к воздействию кислот, то бактерии можно окрашивать несколькими методами: штамповка, окрашивание по Циль-Нильсену, по методу Хименес, Giemsa и по измененному методу Koster. Из-за недостатка специфичности положительное выявление является единственным применимым свидетельством наличия ку-лихорадки, поэтому необходимо проводить подтверждающие тесты.

Демонстрация возбудителя методом иммуногистохимического окрашивания, способом in-situ гибридизации или при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) является более специфичной и чувствительной по сравнению с классическими методами окрашивания. На рынке не представлены специфические антитела для иммуногистохимических исследований, но предлагаются наборы ПЦР для жвачных, которыми можно легко воспользоваться в условиях лаборатории, оборудованной надлежащим образом. ПЦР считается подходящим и надежным тестом для проведения скрининга большого количества различных образцов. Инструментом для диагностики ку- лихорадки является ПЦР.

Широко используются два метода типирования на основе ПЦР: мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов (MLVA) и мультиспейсер-типирование последовательностей (MST), позволяющие типировать Coxiella burnetii без необходимости выделения организма.

**4.3 Серологические тесты**

Могут быть использованы следующие тесты: реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), реакция связывания комплемента (РСК). Наличие специфических IgG антител является свидетельством недавнего заражения Coxiella burnetii или более раннего воздействия вируса. Различные методы ИФА предпочтительней с практической точки зрения и по причине их большей чувствительности.

Серологические антигены базируются на двух основных антигенных формах Coxiella burnetii: фаза I, полученная из селезенок после прививания лабораторным животным, и фаза II, полученная в результате повторных пассажей на эмбрионах кур или в культуре клеток. Имеющиеся тесты позволяют выделить антитела к анти-Coxiella burnetii фазе II или обеим фазам I и II.

**4.4 Требования к вакцинам**

Было разработано несколько инактивированных вакцин против ку-лихорадки, но защитными свойствами обладают только вакцины, содержащие или изготовленные из Coxiella burnetii фазы I. На рынке имеется инактивированнанная вакцина фазы I. В зонах риска рекомендуется ежегодно проводить многократные вакцинации животных, в частности молодняка.

**5 Диагностические технологии**

**Таблица 1 – Методы тестирования, доступные для диагностики ку-лихорадки и цели их использования**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | Цель | | | | | |
| Свобода популяции от болезни | Свобода отдельных животных от болезни до передвижения | Вклад в  стратегии  искоренения | Подтверждение  клинических  случаев | Превалентность инфекции - надзор | Иммунный статус у отдельных животных или  популяций  после  вакцинации |
| Идентификация возбудителя | | | | | | |
| ПЦР | +++ | – | +++ | +++ | ++ | +a) |
| Культура | + | – | + | – | + | – |
| Окрашивание | + | – | + | + | + | – |
| Генотипирование | – | – | – | – | ++ | – |
| ИФА | +++ | – | +++ | ++ | +++ | +++ |
| РНИФ | ++ | – | ++ | ++ | ++ | ++ |
| РСК | – | – | – | ++ | + | + |
| \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  а) Подтверждение иммунного статуса должно сопровождаться тестами на отсутствие возбудителя в вагинальных выделениях | | | | | | |

Подтверждение положительной идентификации Coxiella burnetii у отдельного животного является методом для обоснования диагноза. Методы диагностики ку-лихорадки позволяют интерпретировать диагноз только на уровне популяции, а не на уровне отдельного животного. Результаты лабораторных тестов следует интерпретировать в контексте истории стада (выкидыши, вакцинация, передвижения и заносы болезней и пр.).

Coxiella burnetii может проявляться разными способами в зависимости от типа образца и цели исследований. Способность направлять и определять количество ДНК Coxiella burnetii с помощью ПЦР в реальном времени в значительной степени усиливает диагностические и научно-исследовательские подходы. Чтобы выявить, выделяются ли бактерий в окружающую среду, можно взять пробы влагалищных секретов, молока или молозива у отдельных животных или пробы сборного молока. Выявить животных, выделяющих бактерии в окружающую среду, сложно, т.к. динамика выделения бактерий изучена не в полной мере. Вариабельность в процессе выделения возбудителя в окружающую среду животными (различные способы выделения, периодическое выделение) не позволяет рассчитывать на ПЦР в плане определения инфекционного статуса. Можно провести серологические анализы с использованием ИФА, РНИФ, РСК. Относительная чувствительность у РСК наиболее низка, но у теста отмечают высокую специфичность для высоких уровней антител против Coxiella burnetii, выработанных в стадах, где отмечены случаи выкидыша на фоне заражения ку-лихорадкой. Недостаток РНИФ заключается в его меньшей воспроизводимости между операторами, между лабораториями. Хотя методы ИФА не в полной мере валидированы и гармонизированы, они являются надежными и их можно автоматизитировать и рекомендовать для рутинного серологического тестирования животных на ку-лихорадку.

Серологический надзор является хорошим способом оценки превалентности. Наличие специфических антител против Coxiella burnetii является доказательством недавнего заражения, равно как и воздействия возбудителя в прошлом. Для проведения скрининга в стадах подходят серологические анализы, но на уровне отдельных животных интерпретировать результаты не представляется возможным. Значительная доля животных, выделяющих Coxiella burnetii, и некоторые животные, у которых наблюдали выкидыши, вызванные ку-лихорадкой, оказывались сероотрицательными. Отбор проб нацелен на репрезентативное количество животных (а именно, из различных возрастных категорий). Стратегия отбора проб должна учитывать возможность низкой превалентности, если нет сведений по превалентности в изучаемой области. В ином случае тестирование сборного молока (BTM) или собранных в пул образцов отдельных животных (вагинальные смывы или пробы молока) можно использовать для оценки превалентности, но их необходимо оценить относительно внутристадной превалентности выделения возбудителя.

Статус стада оценивают серологически, исследовав всех животных в стаде (или значительную выборку) с помощью ИФА. Возможно получение противоречивых результатов при использовании различных наборов ИФА. Одним из вариантов может быть использование минимум трех наборов для определения статуса сыворотки. Имеющиеся в наличии серологические методы не позволяют отличить зараженных животных от вакцинированных. Необходим анализ сборного молока или отдельных проб (вагинальные смывы, предпочтительно во время родов) в ПЦР и может появиться необходимость его повторить, если целью является определение статуса свободы. Отдельных животных можно признать свободными от возбудителя, если стадо свободно и не имеет серологической или клинической истории ку-лихорадки. Статус животного со временем может меняться из-за передачи возбудителя по воздуху.

ПЦР – наиболее надежный инструмент диагностики инфекционных выкидышей. Для диагностики в лабораторных условиях с учетом серий выкидышей и мертворождений, необходимо брать пробы от абортированных плодов, плаценты и вагинальных выделений вскоре после выкидыша или родов. Своевременное выявление череды выкидышей в стаде, связанных с ку-лихорадкой, и применение соответствующих корректирующих мер, необходимо для контроля передачи инфекции, как в рамках фермы, так и в условиях внешней среды. Подтверждение клинических случаев всегда должно включать дифференциальное расследование в отношении основных возбудителей, вызывающих выкидыши, и должно быть проведено как минимум на двух абортированных животных. Интерпретировать результаты можно только на уровне группы. Положительным случаем считают стадо с клиническими признаками болезни (выкидыши и/или мертворождение), в котором подтверждено наличие возбудителя. При возможности следует собрать пробы вагинальных мазков сразу после или не позднее 8 дней после выкидыша, чтобы ограничить количество ложноотрицательных результатов ПЦР. Фактически бактериальная нагрузка в вагинальных выделениях может значительно снизиться после выкидыша или родов. Минимум три котеледона из плаценты следует протестировать на Coxiella burnetii, поскольку колонизация может быть гетерогенной. Полезным может быть и процесс количественного определения бактерий в вагинальных и плацентарных мазках, поскольку высокие уровни, вероятнее всего, ассоциированы с клиническими случаями. Полезными могут быть и образцы органов плода, но отрицательные результаты могут вызвать сомнения. С большой долей вероятности бактерии распространяются на различные органы (селезенку, легкие, печень, желудок и пр.) в зависимости от течения инфекции, таким образом, отсутствие бактерий в одном органе не исключает наличия возбудителя в другом.

При возникновении сложности с интерпретацией результатов диагностических тестов, на уровне стада полезна ассоциация с положительным серологическим результатом. Для тестирования клинических случаев можно пользоваться методами ИФА, РНИФ и РСК, но важно определить характеристики теста в конкретных условиях местности (чувствительность, специфичность, точность относительно точки разделения, воспроизводимость). Серологические пороговые показатели, используемые для диагностики ку-лихорадки, указывают поставщики наборов. Интерпретация результатов требует наличия проб минимум от шести овцематок или коз и десяти коров (в приоритете те из них, у кого наблюдали выкидыши).

Определять иммунный статус популяций после вакцинации следует более чувствительными методами (ИФА и РНИФ). При возможности они должны быть привязаны к ПЦР тестированию вагинальных смывов, собранных во время родов. Если давление инфекции высоко, то вакцинация может только ограничить масштабы инфекции и выделения вируса в окружающую среду, не вызывая при этом устойчивую защиту. Сероконверсия и отсутствие выделения возбудителя через вагинальный секрет при последующих родах указывает на наличие защитного иммунного статуса.

**6 Идентификация возбудителя**

**6.1 Выделение вируса**

Для специальных лабораторных исследований может понадобиться выделение возбудителя. Если микроскопическое исследование выявляет большое количество Coxiella burnetii в сочетании с низким показателем контаминации другими бактериями, то возможно прямое выделение возбудителя путем прививания куриных эмбрионов или культуры клеток. Для выделения рекомендуется концентрация выше 105 бактерий на мл.

а) Куриные яйца с эмбрионами

Порцию плаценты гомогенизируют в фосфатно-буферном растворе (ФБР), который содержит антибиотики (стрептомицин 100-200 мкг/мл и пенициллин или гентамицин 50-100 мкг/мл). После низкоскоростного центрифугирования, вразведения супернатанта вводят 6- и 7-дневный куриный эмбрион через желточный мешок. Предпочтительно брать яйца от СПФ-кур (свободных от специфической патогенной микрофлоры). Эмбрионов, которые погибают в течение первых 5 дней после инокуляции, отбраковывают. Содержимое желточных мешков собирают через 10-15 дней после инкубации. Окрашенные мазки со стенки желточного мешка проверяют на отсутствие бактериальной контаминации и для установления наличия Coxiella burnetiid. Для выявления наличия *C. burnetii*, и с целью мониторинга процесса выделения возбудителя можно использовать ПЦР анализ. Дальнейшие пассажи могут потребоваться для получения изолята в чистой культуре.

б) Клеточная культура

Система клеточной микрокультуры из коммерческого набора, использованного для культуры вируса, однослойная клеточная культура в цилиндрическом флаконе, была адаптирована для выделения строгих или факультативных внутриклеточных бактерий, включая Coxiella burnetii. Суспензии проб вводят в фибробласты легкого эмбриона человека (HEL), выращенные на покровном стекле толщиной 1 см2 в цилиндрическом флаконе. Можно использовать различные клеточные линии для наблюдения за размножением типичных вакуолей Coxiella burnetii. Центрифугирование в течение 1 часа при 700 g стимулирует прикрепление бактерий к клеткам и облегчает их проникновение в клетки. Три цилиндрических флакона используют для одной пробы, и на 3, 10, 21 дни с помощью инвертационного микроскопа проверяют цитопатогенное действие (ЦПД) типичных вакуолей Coxiella burnetii в клетках. Через 10 дней обнаружение роста Coxiella burnetii в клетках осуществляют непосредственно на предметном стекле внутри цилиндрического флакона с помощью реакции прямой иммунофлюоресценции с поликлональными антителами против Coxiella burnetii и соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцинизотиоцианатом (ФИТЦ). Клетки из оставшегося цилиндрического флакона собирают и переносят в 25 см2 колбу с культурой. Инкубацию можно проводить в течение 3 месяцев с заменой культуральной среды раз в неделю (трипсинизацию не используют). Заражение можно проверять с помощью микроскопии цитоцентрифугированных клеток, окрашенных по методу Хименес, из культурального супернатанта и с помощью ПЦР культурального супернатанта. Если наблюдения за ЦПД и окрашивание по методу Хименес или результаты ПЦР положительны, то в 75 см2 культуральном флаконе проводят пассаж. Культуральный супернатант затем вводят на непрерывные слои клеток Vero или фибробласты мышей линии L929 в 150 см2 культуральном флаконе, чтобы установить изолят Coxiella burnetii. Данный метод был разработан для людей, но может быть адаптирован и для животных.

в) Лабораторные животные

В случае с сильно контаминированными пробами плаценты, вагинальных выделений фекалий, молока может потребоваться прививание лабораторных животных в качестве системы фильтрации. Экспериментально зараженных грызунов необходимо содержать в надлежащих условиях, гарантирующих биологическую безопасность и условия для сдерживания возбудителей, определенные в рамках анализа на биологические риски. Мыши и морские свинки - наиболее подходящие лабораторные животные для этих целей. После внутрибрюшного введения дозы в объеме 0,5 мл на животное можно контролировать температуру тела и статус антител. Настоящим методом можно пользоваться совместно с серологическими тестами на других морских свинках или мышах, которым ввели такие же образцы. Сыворотки собирают через 21 день после введения. Положительный результат подтверждает диагноз - заражение Coxiella burnetii. Если развивается пирексия, то животное убивают, удаляют селезенку для выделения возбудителя путем введения в куриный эмбрион или в культуры клеток. Микроскопические исследования Coxiella burnetii можно проводить с использованием отпечатков и окрашивания собранных образцов селезенки. В качестве альтернативы процесс можно упростить путем ПЦР для выявления ДНК Coxiella burnetii на селезенке.

**6.2 Окрашивание**

Если есть основания подозревать, что причиной выкидыша является инфекционное заболевание, готовят мазки котиледонов плаценты на предметных стеклах для микроскопического исследования. Для этих целей можно использовать селезенку, легкие, печень и содержимое сычуга абортированного плода или вагинальные выделения. Указанные материалы можно окрасить несколькими методами: Stamp, Хименес, Macchiavello, Giemsa и измененный вариант Koster. Наилучшие результаты получают при использовании первых трех методик. Эти методы близки к модифицированному методу Zhiel-Neelsen, для которого используют основной фуксин для окрашивания бактерий. Например, окрашивание по методу Stamp выполняют с 0,4 % раствором основного фуксина, за которым следует быстрое обесцвечивание 0,5 % раствором уксусной кислоты и контрокрашивание 1 % раствором метиленового синего или малахитового зеленого. Мазки проверяют под микроскопом с масляно-иммерсионными линзами (× 500 или более). Метод Stamp предпочтительней в условиях ветеринарных диагностических лабораторий, в то время как метод Gimenez более распространен для мониторинга инфицированных клеток в научно-исследовательских лабораториях. Gimenez наиболее быстрый метод, так как кислый раствор не включают для дифференциации. Coxiella burnetii проявляется в виде большого количества тонких, розовых коккобактерий на синем или зеленом фоне. Порой их сложно выявить из-за небольшого размера, но эта сложность компенсируется большим количеством бактерий; часто включения в клетки хозяина проявляются в виде скоплений красного цвета на синем или зеленом фоне. Данный способ окрашивания является экспресс-методом. Предел обнаружения довольно высок (> 105 бактерий/мл) и подходит для клинической диагностики, поскольку в положительных пробах присутствуют высокие уровни бактерий. Необходимо с особым вниманием интерпретировать результаты, поскольку микроскопически Coxiella burnetii можно перепутать с Chamydia abortus или Brucella spp. Но при использовании этой же процедуры окрашивания Chamydia демонстрирует более четкие границы, бактерия имеет округлую форму, небольшие размеры. Brucella spp отличается более крупными размерами (0,6-1,5 мкм в длину × 0,5-0,7 мкм в ширину), более четкими границами и окрашивается более интенсивно. Для сравнения следует использовать положительные контрольные предметные стекла с Coxiella burnetii, Chamydia и Brucella spp. Диагностика клинических случаев на основе микроскопии в сочетании с положительными серологическими результатами обычно подходит для рутинных целей. Когда результаты биологического окрашивания не убедительны, то можно пользоваться другим специальным методом для подтверждения. Предпочтительно использовать ПЦР.

**6.3 Специфические методы обнаружения**

Обнаружить Coxiella burnetii в пробах можно с помощью специфической иммунодетекции (ИФА с захватом, иммуногистохимия), in-situ гибридизации или амплификации ДНК. Иммнуногистологические исследования можно проводить с тканями, погруженными в парафин, или на мазках, зафиксированных в ацетоне. В качестве метода используют непрямую иммунофлуоресценцию или иммунопероксидазный анализ со специфическими поликлональными антителами против Coxiella burnetii, выработанными лабораторными животными (кролики и морские свинки). Антивидовой конъюгат против IgG (кролик или морская свинка), меченный ФИТЦ или пероксидазой, используют для визуализации бактерий. Контрольные положительные предметные стекла с антигеном Coxiella burnetii необходимы для сравнения.

Флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) с использованием специфических олигонуклеотидных зондов, нацеленных на 16s рРНК, можно использовать на тканях, погруженных в парафин, особенно на образцах плаценты.

Методы ПЦР успешно применялись для выявления ДНК Coxiella burnetii в культурах клеток и биологических пробах. Чтобы гарантировать безопасность лабораторного персонала, пробы биологического материала можно инактивировать до ПЦР путем нагревания до 90 °С в течение 30-60 минут в зависимости от вида пробы, размера или веса. Процесс инактивации необходимо проверять и валидировать до использования в соответствии с условиями местности. ПЦР проводят в лабораториях, оборудованных должным образом, с использованием праймеров, полученных от различных мишеней, таких как многоэкземплярная инсерционная последовательность IS1111 (учетный номер М80806), используется наиболее широко. Использование указанных праймеров для амплификации данной последовательности позволяет увеличить чувствительность теста благодаря наличию нескольких копий геномов Coxiella burnetii. Другие гены-мишени, используемые в ПЦР для специфической идентификации Coxiella burnetii: ген супероксид-дисмутаза (SodB) (учетный номер М74242); coml, кодирующий 27kDA белок внешней мембраны (учетный номер АВ 004712); оперон теплового шока, кодирующий два белка теплового шока (htpA и htpB) (учетный номер М20482); изоцитратдегидрогеназа (icd) (учетный номер AF069035); белок, усиливающий инфективность макрофагов (cbmip) (учетный номер U14170).

Примечание – Некоторые последовательности праймеров и зондов можно получить на сайте Французского национального референтного центра по ку-лихорадке у человека.

ПЦР в реальном времени дает дополнительные средства для выявления и количественного определения. Что касается традиционной ПЦР, то используют различные гены-мишени: например, IS1111; IS30; com1; icd. Для количественного определения бактерий в биологических образцах с использованием ПЦР в реальном времени рекомендуется амплифицировать уникальную и специфическую последовательность. Недавние сведения показывают, что количество инсерционных последовательностей (IS 1111) может довольно серьезно варьироваться (от 7 до 110), в зависимости от изолята. Несмотря на то, что использование этой последовательности может увеличить чувствительность теста, он может быть и не достаточно точен для количественного определения при использовании различных штаммов. Он вполне информативен и точен для больших количеств бактерий (т.е. > 104 для вагинальных смывов) при диагностике выкидышей. Что касается комплексных матриц, необходимо оценить элюаты ДНК на способность ингибировать ПЦР путем добавления внутреннего ДНК контроля (как последовательность гена-мишени GAPDH) или внешнего контроля.

Примечание – Имеются готовые к использованию наборы, которые могут выявить бактерии в различных видах проб. Специфические количественные методы на основе ПЦР наборов были валидированы для диагностики выкидышей в соответствии с французским стандартом валидации ПЦР в реальном времени.

**6.4 Методы генотипирования**

Судя по широкому кругу хозяев, способности возбудителя длительно сохраняться в окружающей среде, и многочисленным вариантам воздушно-капельного распространения, становится очевидно, что эпидемиология ку-лихорадки довольно сложна.

Для характеристики штаммов Coxiella burnetii использовали несколько методов типирования. Например, рестрикционная эндонуклеаза в геномной ДНК, гель- электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) и секвенирование и/или ПЦР-ПДРФ (Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов - RFLP) генов icd, com1, mucZ. Были описаны два метода типирования на основе ПЦР: мультилокусный анализ тандемных повторов (MLVA) и мультиспейсерное сиквенс типирование (MST), которые позволяют типировать Coxiella burnetii без необходимости выделения организма. Продолжаются научные исследования в области разработки новых подходов, таких как однонуклеотидный полиморфизм (SNP), сравнения их дискриминационных возможностей и информативной ценности.

MLVA и MST считаются наиболее дискриминационными методами в отношении Coxiella burnetii, позволяя идентифицировать до 36 различных генотипов. Эти методы все чаще используют для характеристики полевых образцов или изолятов.

**7 Серологические тесты**

**7.1 Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)**

7.1.1 Настоящая методика отличается высокой чувствительностью и достаточной специфичностью. Настоящим методом легко пользоваться в условиях лабораторий, имеющих необходимое оборудование (спектрофотометр) и реагенты. ИФА предпочтительней, чем РНИФ и РСК. Особенно для диагностики болезней животных, поскольку она удобна для крупномасштабного скрининга и обладает наибольшей робастностью. Готовые к использованию наборы есть в продаже и позволяют выявить смеси антител антифазы I и II. Контроль качества для некоторых наборов ИФА был усовершенствован при помощи внешних эталонных материалов, предоставленных французской национальной референтной лабораторией, и позволяющих стандартизировать партии наборов.

Антиген Coxiella burnetii для ИФА готовят, выращивая стандартные штаммы в куриных эмбрионах или в культуре клеток, как описано ниже для РИФ. Лунки микропланшета покрывают инактивированным цельноклеточным антигеном Coxiella burnetii. Разведенные образцы сыворотки добавляют в лунки, и они реагируют на антигены, связанные с твердофазным носителем. Несвязанный материал удаляют смыванием после необходимого периода инкубации. Конъюгат (меченный пероксидазой хрена антижвачный иммуноглобулин) вступает в реакцию со специфическими антителами, связанными с антигеном. Конъюгат, не вступивший в реакцию, удаляют смыванием после необходимого периода инкубации. Добавляют ферментный субстрат. Степень конверсии субстрата пропорциональна количеству связанных антител. Реакцию останавливают после необходимого периода времени и уровень окрашивания измеряют спектрофотометрическим способом.

7.1.2 Оборудование и реагенты

Для проведения анализа используют следующее оборудование и реагенты:

- титрационные микропланшеты с 96 плоскодонными лунками, только что или ранее покрытые антигенами Coxiella burnetii;

- микропланшет-ридер (спектрофотометр;

- 405 и/или 450 и/или 492 нм фильтры);

- влажный инкубатор с температурой 37°С;

- 8 и 12-канальные пипетки с одноразовыми пластиковыми наконечниками;

- шейкер для микропланшетов (на усмотрение);

- положительные и отрицательные контрольные сыворотки;

- конъюгат (анти иммуноглобулин жвачных или белок A/G, маркированный пероксидазой);

- десятикратная концентрация разбавителя (ФБР-Tween);

- дистиллированная вода;

- субстрат или хромаген (ТМВ [Тетраметилбензидин]);

- ABTS (2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6- сульфокислота) для пероксидазы);

- перекись водорода.

7.1.3 Процедура тестирования

а) Пробы сыворотки разводят, включая контрольные сыворотки, до необходимой концентрации (1/100 или 1/400 в зависимости от используемого набора) и распределяют 0,1 мл на лунку в двух повторностях. Контрольные сыворотки включают положительные и отрицательные сыворотки, предоставленные производителем, и внутреннюю положительную эталонную сыворотку из лаборатории, чтобы сравнить титры между разными тестами.

б) Планшет накрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре в течение 30–90 минут. Удаляют содержимое и промывают три раза в промывочном растворе при комнатной температуре.

в) Добавляют необходимое разведение свежеприготовленного конъюгата в лунки (0,1 мл на лунку).

г) Накрывают каждый планшет и инкубируют по 7.1.2 (б). Снова промывают три раза.

д) Добавляют 0,1 мл свежеприготовленного раствора хромогенного субстрата в каждую лунку (например, ТВМ в 0,1 М уксусной кислоты и 30 % Н2О2 раствор (0,2 мкл/мл); или 0,25 мМ ABTS в цитратно-фосфатном буфере, рН 5,0 и 30 % H2O2 раствор (0,1 мкл/мл)).

е) Встряхивают планшет, затем инкубируют в соответствии с рекомендациями производителя, останавливают реакцию, добавив стоп-раствор в каждую лунку, например, 0,05 мл 2 М серной кислоты для ТВМ или 10 % додецилсульфат натрия для ABTS.

ж) Коэффициент поглощения с каждой лунки считают с помощью ридера при 405 нм (ABTS) или 450 нм (TMB). Показатели поглощения используются для расчета результатов.

7.1.4 Обработка результатов

В коммерческих наборах показатели для интерпретации вложены в сами наборы.

Например, рассчитывают среднюю абсорбцию (Ab) образца сыворотки и положительных (Abpos) и отрицательных (Abneg) контрольных сывороток, и для каждой сыворотки рассчитывают процент по формуле (1):

Ab - Abneg

Abpos – Abneg ×100 , (1)

Результаты обрабатывают по следующей схеме:

Ab < 30% отрицательная сыворотка

Ab > 30% положительная сыворотка

Подготавливают контрольную карту и рассчитывают погрешность измерений величины в точке разделения, чтобы интерпретировать результаты, близкие к точке разделения.

**7.2 Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ)**

7.2.1 В системе здравоохранения адаптированный РНИФ в виде микроиммунофлюоресценции является методом серодиагностики ку-лихорадки. Процедуру можно адаптировать для выполнения имумнопероксидазного анализа. Вкратце, используются антигены Coxiella burnetii фазы I и II; антигены фазы II получают выращиванием эталонного штамма Coxiella burnetii Nine Mile в культуре клеток, антиген фазы I получают из селезенки лабораторных животных. Антиген разводят, выкапывают в лунки предметного стекла, дают высохнуть и фиксируют в ацетоне. Две формы инфекции у людей, острая и хроническая, демонстрируют разные серологические профили: во время острой фазы ку-лихорадки уровень антител IgG повышается только против фазы II, а при хронической форме ку-лихорадки наблюдают высокие уровни антител IgG и к фазе II, и к фазе I.

Примечание – Лунки, отмеченные антигенами, можно купить у поставщика, предоставляющего форму фазы II или фазы I Coxiella burnetii. Их можно адаптировать путем замены человеческого конъюгата конъюгатом, адаптированным к различным видам животных. Интепретация в отношении хронической или острой формы не была еще валидирована для жвачных.

7.2.2 Подготовка антигена

В настоящем пункте приведено описание процедуры подготовки Coxiella burnetii для серологической диагностики РНИФ на основе антигенов фазы II и фазы I. Значительные количества Coxiella burnetii (> 1010 бактерий) можно получить через 2 – 5 недель в куриных эмбрионах или культурах клеток. На заражение мышей может потребоваться 7 – 14 дней. Очистка бактерий от материала хозяина включает дифференциальное центрифугирование и занимает от одного до двух дней.

Штаммы Coxiella burnetii Nine Mile Фазы II выращивают в непрерывном слое Vero или L929 клеток в колбах для разведения культуры объемом 150 см2 при 35 °С при 5 % CO2 с минимальной поддерживающей средой, обогащенной 2 mM L-глутамином и 4 % фетальной телячьей сывороткой. Заражение контролируют с помощью микроскопического исследования внутриклеточных вакуолей или с помощью клеток, окрашенных по методу Gimenez, собранных из супернатанта в колбах. Для целей текущего мониторинга оказались чрезвычайно полезными недавние специфические количественные ПЦР исследования в реальном времени. Если наблюдают тяжелое заражение Coxiella burnetii, супернатанты из 15 колб по-отдельности осаждают центрифугированием (5000 g, 15 минут), ресуспендируют в 1 мл ФБР с 0,1 % формальдегида и инкубируют на 24 часа при 4 °С. После объединения в пул оставшиеся клетки разрушают ультразвуком. Клеточные дебрис удаляют в ходе двух последующих этапов центрифугирования (100 g, 10 минут каждое). Суспензию в объеме 15 мл затем центрифугируют через 20 мл ФБР с 25 % сахарозой (6000 g, 30 минут, без перерыва). Полученный в результате осадок смывают трижды в ФБР (6000 g, 10 минут), ресуспендируют в наименьшем возможном объеме стерильной дистиллированной воды и доводят до 2 мг/мл с помощью УФ-спектроскопии. Затем добавляют антибактериальный консервант, азид натрия, в итоговом разведении 0,1 % или тиомерсал в концентрации 0,01 %. Антиген, приготовленный таким образом, замораживают при минус 20 °С.

Для получения антигена фазы I мышам вводят возбудитель Coxiella burnetii, выращенный в клетках (в основном в фазе II). Селезенки удаляют через 9 дней после заражения. Каждую выращивают в 7,5 мл МЕМ и вводят в три культуральные колбы объемом 75 см2, содержащие клеточные монослои L929 или Vero (2,5 мл на колбу). Амплификацию Coxiella burnetii фазы I проводят в течение 4 недель с заменой культуральной среды раз в неделю. Зараженные клетки затем собирают, а бактерии очищают по схеме, описанной выше (в основном в фазе I).

Производить антиген можно путем культивирования Coxiella burnetii в СПФ-эмбрионах. Микроорганизм вводят в желточный мешок яйца с 6 – 7 дневными эмбрионами, затем через 10 – 15 дней инкубации осуществляют сбор. Зараженные желточные мешки имеют типичную соломенно-желтую окраску с белыми пятнами. Незараженные желточные мешки имеют оранжевую окраску и отличаются вязкой консистенцией. Все эмбрионы, погибшие до 5 дня инкубации, отбраковывают. Штамм, используемый для инокуляции яиц, является 1/100 гомогенатом желточного мешка в ФБР, содержащем пенициллин (500 международных единиц/мл) и стрептомицин (0,5 мг/мл). Желточные мешки объединяют в пул и гомогенизируют с тремя частями ФБР. Суспензию инактивируют в 1,6 % формальдегиде в течение 24 часов при температуре 37 °С. Затем сливают жидкий липидный супернатант. Суспензию центрифугируют при умеренной скорости (~ 500 г) в течение 30 минут. После удаления жидкости супернатанта добавляют больше ФБР и повторяют центрифугирование. Итоговую суспензию разводят в ФБР. В качестве антибактериального консерванта добавляют азид натрия или тиомерсал. Обильное содержание Coxiella burnetii и отсутствие бактериальных контаминантов в гомогенатах желточных мешков, суспендированных в ФБР проверяют при микроскопическом исследовании мазка на предметном стекле, окрашенном по методу Stamp. Чтобы получить антиген фазы I можно размножить Coxiella burnetii, выделенный из материала селезенки зараженных лабораторных животных, поскольку измельченные экстракты селезенки далее переносят в желточные мешки, учитывая, что количество клеток фазы I по-прежнему высоко до шестого пассажа на яйцах.

Титрации антигена с тремя разными известными сыворотками (с высокими, умеренными и низкими титрами, соответственно) достаточно, чтобы определить необходимое разведение для дальнейших тестов иммунофлюоресценции.

7.2.3 Оборудование и реагенты

Микроскоп для флуоресценции, влажная камера, чаша для промывания.

Необходимо найти подходящие для антигенов предметные стекла. Антигены могут быть либо приготовлены в лаборатории или их можно купить у поставщика. Описанный метод взят из набора BioMerieux, в качестве примера. На каждом готовом к использованию предметном стекле расположено 12 лунок, 7 мм в диаметре каждая, покрытые антигеном фазы II, полученных из культуры Vero клеток, и их можно хранить при 4 °С или минус 20 °C.

Концентрированный флуоресцентный конъюгат, который следует развести в ФБР 1 % голубой Эванс в разведении, рекомендованном производителем.

ФБР, забуференный глицерин, 1 % раствор красителя голубой Эванс.

7.2.4 Процедура тестирования

Двукратные разведения тестируемой сыворотки размещают на предметных стеклах с лунками, покрытыми одним или двумя антигенами. При наличии специфических антител они связываются антигеном на стекле. Затем комплекс выявляют в ходе флуоресценции после добавления флуоресцентного конъюгата, распознающего видоспецифические иммуноглобулины.

а) Готовят серийные разведения сывороток от 1/40 до 1/640 в ФБР.

б) Нагревают предметные стекла, ранее покрытые антигеном, до комнатной температуры. Лунки не трогают.

в) Добавляют 20 мкл каждого разведения сыворотки в лунки. Добавляют отрицательные и положительные контрольные сыворотки. В одну лунку добавляют 20 мкл ФБР в качестве контроля антигена.

г) Инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при 37 °С. Промывают предметное стекло дважды в ФБР в течение 10 минут каждое. Ополаскивают дистиллированной водой и сушат на воздухе.

д) Добавляют в лунки, включая контроли, 20 мкл конъюгата против соответствующего вида (например, кроличий анти-козий или анти-овечий IgG[H+L], меченный ФИТЦ), свежеразбавленного в ФБР + голубой Эванс. Инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при 37 °С. Ополаскивают дистиллированной водой и сушат на воздухе. Добавляют несколько капель забуференного глицерина и накрывают покровным стеклом. Проверяют в флуоресцентном микроскопе при увеличении × 400 или больше.

7.2.5 Обработка результатов

Положительная реакция проявляет себя в виде небольших ярких включений на темном фоне. Необходимо проверить, чтобы сам конъюгат и отрицательная контрольная сыворотка давали отрицательный результат (отсутствие небольших ярких включений). Неспецифическая флуоресценция обычно проявляется пятнами неправильной формы. Положительные контроли должны давать известные титры с плюс минус одним разведением.

**7.3 Реакция связывания комплимента (РСК)**

7.3.1 РСК считается менее чувствительным тестом, чем ИФА и РНИФ, и по этой причине его не используют для диагностики болезней животных.

Настоящий микрометод холодной фиксации типа, разработанный Kolmer, применяют с использованием 96-луночного микропланшета с U-образным дном. Данный метод позволяет выявить комплемент-фиксирующие антитела, присутствующие в сыворотке. В настоящем методе используют антиген смеси фазы I и II, приготовленной из штаммов человека или штамма Nine Mile.

Реакцию проводят в два этапа. Сначала смешивают антиген и комплемент-фиксирующие антитела, инкубируют их в течение ночи при 4 °С. На следующий день добавляют эритроциты овцы, сенсибилизированные антиовечьей сывороткой. Фиксация комплемента комплексом антиген/антитело на первом этапе не допускает лизиса эритроцитов; в противоположность этому, если нет комплемент-фиксирующих антител, то комплемент вызывает лизис сенсибилизированных эритроцитов. Скорость гемолиза обратно пропорциональна уровню специфических антител в образце сыворотки.

7.3.2 Реагенты

Вероналовый/кальциевый/магниевый буфер (VB), pH 7,2.

Гемолитическая система: смесь из равных частей 2 % суспензии эритроцитов овцы в VB; гемолитическая сыворотка, разведенная до специфического титра в VB.

Комплемент: коммерческий лиофилизированный препарат или свежая сыворотка от морской свинки.

Антиген: используйте коммерческие антигены в концентрации титров, рекомендованных производителем, если титрацию антигенов проводят этим методом.

Положительные и отрицательный контрольные сыворотки.

7.3.3 Предварительная титрация

а) Эритроциты овцы разводят до итоговой концентрации 2 % в VB.

б) Гемолитическую сыворотку титруют на микропланшете: 25 мкл комплемента в известной гемолитической концентрации (например, 1/30); 25 мкл растущих разведений гемолитической сыворотки + 2 % овечьих эритроцитов. Включают контроли без комплемента. Инкубируют в течение 30 минут при 37 °С. Устанавливают разведение, равное 2 гемолитическим единицам.

в) Антиген разводят в соответствии с рекомендациями производителя. Антиген можно титровать: приготовить растущие разведения антигена (25 мкл горизонтально) и положительную сыворотку с известным показателем титров (25 мкл, вертикально). Добавляют 25 мкл суспензии сенсибилизированных эритроцитов и инкубируют в течение 30 минут при 37 °С. Титр антигена – наивысшее разведение, вызывающее положительную реакцию с наивысшим разведением сыворотки. Проверяют отсутствие антикомплементарной активности антигена при различных разведениях.

г) Комплемент титруют на микропланшете: серийно разводят комплемент или сыворотку от морской свинки в VB, например, с 1/15 до 1/200. В каждую лунку, содержащую 25 мкл этого разведения, добавляют 25 мкл антигена и 25 мкл гемолитической системы. Инкубируют в течение 30 минут при 37 °С и устанавливают разведение, равное 2 гемолитическим единицам комплемента.

7.3.4 Процедура тестирования

а) Готовят двукратное разведение образцов инактивированной сыворотки от 1/10 до 1/320 в шести лунках и в четырех дополнительных лунках при разведениях от 1/10 до 1/80 для выявления антикомплементарной активности (25 мкл на лунку).

б) Добавляют 25 мкл разведенного антигена или 25 мкл VB в лунки с контрольной сывороткой.

в) Добавляют 25 мкл разведенного комплемента во все лунки. Планшет накрывают пластиковой клейкой пленкой и инкубируют в течение 18 часов при 4 °C.

г) Вынимают планшеты из холодильника. Выдерживают их до достижения комнатной температуры и добавляют 25 мкл свежеприготовленной гемолитической системы. Инкубируют при 37 °С в течение 30 минут. Планшеты центрифугируют при 500 г в течение 5 минут при 4 °С. Проверяют контроли и рассчитывают результаты.

7.3.5 Обработка результатов

Титры между 1/10 и 1/40 указывают на латентное заражение. Титры от 1/80 и выше в одной или нескольких сыворотках из группы или от пяти до десяти животных указывают на активную фазу заражения.

**8 Требования к вакцинам**

**8.1 Предпосылки**

8.1.1 Инактифированная вакцина

8.1.1.1 Обоснование и целевое использование продукта

Для борьбы с инфекцией, вызванной C.burnetii, у людей и животных, жвачных животных можно вакцинировать инактивированными вакцинами против C.burnetii. Целью этой вакцинации является уменьшение выделений в окружающую среду и рисков аборта. Инактивированные вакцины, имеющиеся на рынке, получены из штаммов C. burnetii фазы I (Nine Mile) или фазы II, но защитным антигеном C. burnetii является полноразмерный ЛПС фазы I. Чтобы вызвать соответствующий иммунный ответ при минимизации угроз безопасности, эффективное производство вакцин должно быть нацелено на вакцины, содержащие антиген фазы I.

**8.2 Описание производства и минимальные требования к вакцинам**

8.2.1 Характеристики посеного материала

8.2.1.1 Биологические характеристики

Вакцинный штамм C.burnetii должен быть хорошо охарактеризован, иметь известное происхождение, быть чистым и состоять исключительно из выбранной фазы.

8.2.1.2 Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних агентов)

Посевной материал Coxiella burnetii должен представлять собой чистую культуру и не содержать посторонние бактерии и грибки.

8.2.1.3 Валидация в качестве вакцинного штамма

Пригодность в качестве вакцинного штамма подтверждена испытаниями эффективности и безопасности.

8.2.2 Метод производства

8.2.2.1 Процедура

Поскольку текущие производственные штаммы получены из вирулентных полевых изолятов, размножение живых бактерий должно осуществляться с использованием соответствующих процедур биобезопасности и сдерживания, установленных по результатам анализа биорисков. Персонал, задействованный в этой работе, должен быть хорошо обучен и должен быть вакцинирован против ку-лихорадки.

Производственный процесс включает культивирование C. burnetii на мембране желточного мешка куриного эмбриона, не содержащего специфические патогены (SPF). Через 5 – 9 дней инкубации яйца помещают для охлаждения и собирают желточные мешки. Сбор гомогенизируют, разбавляют в буфере, а затем инактивируют соответствующим инактивирующим агентом (например, формальдегидом), чтобы гарантировать, что ни один живой организм не выживет. Инактивированный антиген подвергают 5-10-кратному концентрированию, после чего проводят комбинированные этапы химической экстракции и центрифугирования для уменьшения количества остаточного материала яиц в матрице. Это позволит получить более чистый антиген и избежать поствакцинальных реакций у целевых видов при вакцинации конечным продуктом.

Концентрированный очищенный антиген разбавляют и готовят до установленной защитной дозы. Состав вакцины основан на количественном определении антигена (например, по весу или ИФА) и может содержать тиомерсал в качестве консерванта.

В некоторых лабораториях разрабатываются альтернативные процессы производства антигена ку-лихорадки с использованием клеточных культур или выращивания клеток в аксенической среде.

8.2.2.2 Контроль в процессе производства

Как для всех инактивированных вакцин, живой титр определяется до инактивации, чтобы гарантировать, что он ниже максимального значения, для которого была валидирована процедура инактивации. Титр можно определить путем инокуляции яиц или количественной ПЦР. Микробиологическую чистоту культур определяют на каждом этапе производства перед инактивацией. Успех инактивации должен определяться тестом культивирования в соответствующей чувствительной среде (например, яйцах с эмбрионами или клеточной культуре).

Дифференциация антигенов фазы I от антигенов фазы II имеет важное значение, аналитические инструменты должны быть установлены с самого начала процесса разработки вакцины. Эти инструменты должны включать как тесты контроля качества в процессе производства, так и тесты конечного продукта. Для вакцин фазы I очень важны как дифференциация, так и количественное определение антигена фазы I. Отличие антигенов фазы I от антигенов фазы II можно определить на клеточном уровне либо с помощью ПЦР, либо с помощью ИФА, а на уровне очищенного антигена или вакцины – с помощью иммунохимических методов (например, дот-блоттинга, ИФА, РНИФ) с использованием фазоспецифических антисывороток. Простейшим качественным методом для этой цели является перекрестная проверка образца с помощью дот-блоттинга с антисыворотками, специфичными как к фазе I, так и к фазе II. Антисыворотки фазы I содержат специфические антитела как к антигенам фазы I, так и к антигенам фазы II, в то время как антисыворотки фазы II содержат только антитела, специфичные к фазе II. Таким образом, бактерии фазы I дадут двойной положительный результат при дот-блоттинге, в то время как бактерии фазы II будут положительными только при использовании антисыворотки фазы II. ПЦР и иммунохимические методы могут служить инструментами идентификации.

Количественное определение очищенного антигена для состава вакцины можно определить по массе, оптической плотности или ИФА. Лучшим выбором для количественного определения антигена является ИФА из-за его высокой чувствительности и специфичности. Поскольку такие анализы отсутствуют в продаже, они должны быть разработаны и утверждены производителями вакцин.

8.2.2.3 Тесты партий готового продукта

а) Стерильность/чистота

Тесты на стерильность проводят на готовом продукте.

б) Идентичность

Идентичность антигенов в инактивированных продуктах обеспечивается за счет концепции посевной серии и качественного производственного контроля. Идентичность и тип фазы должны быть подтверждены на различных этапах производства, например с помощью ИФА или ПЦР.

в) Безопасность

Во многих регионах для выпуска каждой партии не требуются тесты на безопасность, проводимые на целевых животных. При необходимости обычно проводятся стандартные процедуры с использованием меньшего количества животных, чем их используется в тестах на безопасность, требуемых для соответствующего разрешения регулирующих органов, и на животных самого раннего рекомендованного возраста вакцинации.

г) Активность партии

Эффективность ветеринарных вакцин против ку-лихорадки демонстрируется путем вакцинации и последующего заражения целевых видов с использованием гетерологичного штамма в середине беременности. По очевидным причинам безопасности эти испытания должны проводиться в помещениях для животных с использованием соответствующих процедур биологической безопасности и сдерживания, при условии наличия надлежащих мер биобезопасности и при надлежащем уровне защиты. Два основных параметра, которые необходимо оценить – это значительное снижение частоты абортов и снижение числа бактериальных инфекций. Применяемые тесты активности партии коррелируют с гарантированной минимальной защитной дозой и сроком годности вакцины. Методы определения активности in vitro предпочтительнее, чем тесты in vivo. Более предпочтительными являются тесты, которые могут одновременно как определить количество содержание активности, так и обеспечить специальную идентификацию (например, ИФА).

д) Содержание формальдегида

Вакцины, инактивированные формальдегидом, тестируются на его остаточное содержание.

8.2.3 Требования к разрешению контролирующего органа

8.2.3.1 Процесс производства

Производитель должен продемонстрировать, что метод производства сохраняет защитную антигенность и что процедура, используемая для инактивации бактерий, достаточна для полной инактивации. Процесс инактивации должен быть продемонстрирован на максимально возможном титре антигена. Чувствительность теста на инактивацию должна быть продемонстрирована на антигенной матрице таким образом, чтобы тест мог определять титр антигена ниже минимальной инфекционной дозы. Инактивация должна быть продемонстрирована на каждой производственной партии.

8.2.3.2 Требования безопасности

а) Безопасность целевых и нецелевых животных

Безопасность продукта должна быть продемонстрирована на этапе разработки вакцины путем применения обычных доз, передозировок и повторных доз на целевых животных, в расширенных полевых исследованиях в минимальном возрасте вакцинации и на беременных животных. Все лабораторные тесты безопасности проводятся в самом раннем рекомендуемом возрасте для первичной вакцинации. Этот возраст считается наиболее чувствительной категорией к любым признакам непереносимости вакцин.

Лабораторные тесты проводятся в контролируемой среде, в то время как полевые исследования проводятся в условиях нормального использования с ограниченным числом интактных особей или животных, находящихся под плацебо-контролем. Безопасность вакцины подтверждена оценкой признаков местных реакций и общих признаков в течение 21 дня после первой вакцинации.

Влияние на репродуктивную функцию оценивают по данным полевых исследований путем сравнения данных об отелах животных, вакцинированных на разных стадиях беременности вакциной Coxiella и плацебо. Статистическая разница в отношении статистически значимого количества животных между животными, вакцинированными Coxiella и плацебо, должна отсутствовать.

б) Реверсия вирулентности для аттенуированных/живых вакцин и экологические аспекты

Не предусмотрено.

в) Меры предосторожности (риски)

Обычно в месте инъекции можно увидеть пальпируемую реакцию диаметром несколько сантиметров. Реакция уменьшается и исчезает без дальнейшего лечения в течение нескольких дней. Обычно наблюдается небольшое повышение ректальной температуры в течение 4 дней после вакцинации.

8.2.3.3 Требования к эффективности

Эффективность вакцин должна быть продемонстрирована на целевых видах. Партия продукта, используемая в контрольном исследовании, должна представлять окончательный процесс промышленного производства с максимально допустимым числом пассажей, полученным из исходного посевного материала. Эффективность продукта демонстрируется статистически значимой разницей в данных об абортах и выделениях в окружающую среду между вакцинированными и контрольными группами. Например, в случае мелких жвачных может применяться следующий протокол: серонегативные животные вакцинируются ближе к минимально допустимому времени до искусственного осеменения (например, за 3 недели). Животных заражают подкожно в середине беременности гетерологичным контрольным штаммом, откалиброванным на мышах и козах. Уровни специфических антител контролируют с помощью ИФА из сыворотки во время беременности и из молока после родов, чтобы продемонстрировать образование защитного иммунитета. Выделение в окружающую среду контролируют еженедельно после контрольного заражения из образцов кала во время беременности, из вагинальной слизи, молока и через плаценту в случае аборта, и с помощью количественной ПЦР после родов. Уровень абортов в вакцинированных и невакцинированных группах контролируется. В вакцинированной группе должно наблюдаться значительное снижение выделений в окружающую среду и абортов по сравнению с невакцинированной контрольной группой.

Заявления об эффективности могут быть подтверждены расширенными полевыми исследованиями при наличии естественного заражения путем статистического анализа данных о выделении в окружающую среду и абортах с использованием аналитических методов, аналогичных тем, которые используются в лабораторных исследованиях.

8.2.3.4 Вакцины, допускающие стратегию выявления заражения у вакцинированных животных (ВЗВЖ)

Не предусмотрено для данного заболевания.

8.2.3.5 Продолжительность иммунитета

Продолжительность иммунитета подтверждается серологическими данными посредством контрольного заражения или данными о плодовитости в полевых исследованиях.

8.2.3.6 Стабильность

Стабильность вакцины подтверждается испытаниями на высвобождение вакцины, проводимыми через определенные промежутки времени в течение предполагаемого срока годности продукта. Для демонстрации стабильности следует использовать не менее трех репрезентативных партий продукта.

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** Ку-лихорадка, вакцина, антитела,идентификация возбудителя, описание болезни, диагностика, биобезопасность |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** Ку-лихорадка, вакцина, антитела,идентификация возбудителя, описание болезни, диагностика, биобезопасность |

**РАЗРАБОТЧИК**

РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

|  |  |
| --- | --- |
| **Заместитель Генерального директора** | **Амирханова Е.М.** |
| **Руководитель Департамента разработки нормативно-технических документов** | **Сопбеков А.Н.** |
| **Ведущий специалист Департамента разработки нормативно-технических документов** | **Нығыметуллақызы Ә.** |