*Проект*

*Изображение государственного Герба Республики Казахстан*

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА СВИНЕЙ**

**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 3.9.7

**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 | Область применения  Нормативные ссылки  Обозначения и сокращения  Общие положения  Диагностические технологии  Идентификация возбудителя  Серологические тесты  Требования к вакцинам |  |

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА СВИНЕЙ**

**Основные положения**

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

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной диагностики гриппа свиней.

Вирусы гриппа А свиней (ВГА-С) вызывают высококонтагиозную вирусную инфекцию свиней. Инфицирование ВГА-С приводит к развитию респираторного заболевания, характеризующегося кашлем, чиханием, выделениями из носа, повышением ректальной температуры, сонливостью, затрудненностью дыхания и снижением аппетита. В некоторых случаях инфицирование ВГА-С сопровождается нарушениями в репродуктивной сфере, такими как аборты. Клинические признаки и выделение вируса с отделяемым полости носа могут появиться в течение 24 ч после инфицирования. Заболеваемость при инфицировании ВГА-С может достигать 100 %, но смертность обычно низкая. Вторичная бактериальная инфекция может усугубить клинические признаки при инфицировании ВГА-С. Распространение заболевания происходит путем контакта с содержащими ВГА-С выделениями, такими как отделяемое полости носа и аэрозоль, образующийся при кашле или чихании.

**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;

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

РТГА – ингибирование гемагглютинации;

ИФА - твердофазный иммуноферментный анализ.

**4 Общие положения**

**4.1 Идентификация возбудителя**

Образцы для идентификации вируса следует забирать в течение 24 – 72 ч после появления клинических признаков. Следует выбирать животных, не получавших лечения, в острой фазе заболевания с соответствующими клиническими признаками. Вирус легко обнаружить в ткани легких и мазках из полости носа.

*Проект, редакция 1*

Образцы секрета ротовой полости, забираемые с хлопчатобумажных веревок, подвешенных в загонах для свиней и могут использоваться как образцы от групп или популяций животных. Выделение вируса можно проводить на куриных эмбрионах и на стабильных клеточных линиях или первичных культурах клеток. Определить подтип вируса можно с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибирования нейраминидазы на изолятах вируса, или же с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на клиническом материале или на изолятах. Иммуногистохимические исследования можно проводить на фиксированных формалином тканях.

**4.2 Серологические реакции**

РТГА имеет специфичность в отношении подтипов вируса. В идеале сыворотки следует получить с интервалом 1­0 – 21 день. Нарастание титра в четыре или более раза в период между забором первого и второго образца свидетельствует о недавнем инфицировании ВГА-С. Есть другие серологические методы, такие как иммунодиффузия в агаровом геле, непрямая реакция иммунной флюоресценции, реакция нейтрализации вируса и твердофазный ИФА. По причине возрастания антигенного разнообразия вирусов гриппа типа A свиней и потребности в использовании нескольких типов гемагглютинина (H) в РТГА, наблюдается общая тенденция в отношении использования коммерческих твердофазных ИФА, не обладающих специфичностью в отношении подтипов.

**5 Диагностические технологии**

**Таблица 1 – Методы исследования для диагностики ВГА-С и их идентификации возбудителя**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | Цель | | | | | |
| Не зараженная популяция | Отсутствие заражения отдельных особей до перемещения | Участие в политике искоренения | Подтверждение клинических  случаев | Надзор за распространением инфекции | Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации |
| Идентификация возбудителяа) | | | | | | |
| Выделение вируса | + | +++ | ++ | +++ | ++ | – |
| ОТ-ПЦР в реальном времени | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | – |
| Традиционная ПЦР | – | – | – | ++ | – | – |
| Выявление иммунной реакции | | | | | | |
| РТГА | + | + | + | ++ | ++ | +++ |
| ИФА | +++ | +++ | +++ | + | +++ | + |
| Примечание – Анализы ИФА на антигены предназначены для использования у клинически больных животных. Надежность этого метода при использовании у клинически.  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  а) В некоторых ситуациях, для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя | | | | | | |

**6 Идентификация возбудителя**

6.1 ВГА-С потенциально патогенен для человека, все работы с потенциально заразительными диагностическими образцами, куриными эмбрионами и культурами клеток должны проводиться в помещении класса II биобезопасности. При работе с инфицированными свиньями следует использовать дополнительные меры предосторожности (средства индивидуальной защиты), такие как респираторы и защитные приспособления для глаз.

**6.2 Культивирование**

**6.2.1 Обработка образцов**

Легкие можно обработать для выделения вируса различным образом, например, путем промывания стерильными средами, мацерации ткани с использованием пестика и ступки или гомогенизатора, или путем измельчения скальпелем или ножницами. Обработка ткани проводится в культуре клеток с добавлением антибиотиков (например, в 10-кратной рабочей концентрации), при итоговой концентрации 10 – 20 % (масса/объем). Мазки переносят в среду для культуры клеток или фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавкой антибиотиков и сывороточного альбумина крупного рогатого скота (5 мг/мл). Сыворотку крупного рогатого скота не используют. Для пероральных жидкостей может потребоваться корректировка метода обработки образца, используемого для мазков из носа, из-за вязкой природы образца и повышенной склонности к бактериальному загрязнению. Идеальным вариантом является отправка образцов в диагностическую лабораторию в течение ночи на влажном льду, без замораживания. После получения, в лаборатории мазки из полости носа интенсивно размешивают вручную или с помощью вортекса. Мазки из носа и материал легких центрифугируют при 1500–1900 *g* в течение 15 – 30 мин при температуре 4 °C. Забирают надосадочную жидкость и хранят ее до посева при температуре 4 °C. Если надосадочную жидкость необходимо выдержать более 24 ч перед инокуляцией, ее следует хранить при температуре минус 70 °C или ниже. Надосадочную жидкость от образцов легких высевают без дальнейшего разведения. Надосадочную жидкость от мазков и секрета ротовой полости можно высевать без разведения или разводить 1/3 в среде для культуры клеток. Для снижения контаминации бактериями к среде для культуры клеток добавляют антибиотики, использованные при обработке образца, и (или) фильтруют надосадочную жидкость, но это может снизить титр вируса. Для фильтрования, рекомендуется использовать мембрану с низкой адсорбцией белка, такую как мембрана PVDF, с целью минимизации потери вируса. В качестве альтернативы, препарат вируса перед посевом в эмбрионы или культуру клеток можно обработать антибиотиками, такими как гентамицин (100 мкг/мл) или пенициллин (10000 ед./мл стрептомицин (10000 ед./мл) и 2 % фунгизон (250 мг/мл) в течение 30 – 60 мин при температуре 4 °C.

* + 1. **Выделение вируса в культуре клеток**

а) Выделение вируса можно проводить в клеточных линиях и первичной культуре клеток, восприимчивых к инфицированию вирусом гриппа A. Клетки почек собак Мадин-Дарби (MDCK) являются пермиссивными для широкого спектра различных подтипов и штаммов ВГА-С и поэтому представляют собой предпочтительную линию клеток, но можно использовать и первичную культуру клеток почек, семенника, легкого свиней или клетки трахеи свиней.

б) Сомкнутые монослои клеток промывают (через 48 – 72 ч после посева) три раза средой для культуры клеток, содержащей итоговую концентрацию 1 мкг/мл обработанного ТФХМ2 трипсина, концентрация зависит от типа трипсина и использованных клеток (можно использовать концентрации 0,3 – 10 мкг/мл). В среду для культуры клеток можно добавить антибиотики, но не допускается добавление сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота.

в) В культуру клеток высевают соответствующее количество промывной жидкости, суспензии ткани, секрета ротовой полости или надосадочной жидкости от мазка.

Примечание – объем инокулума зависит от размера сосуда с культурой клеток. Обычно высевают 100 – 200 мкл в каждую лунку 24-луночного планшета для культуры клеток, 1 мл в каждую пробирку Лейтона и 0,5 – 2 мл в колбу емкостью 25 см2.

г) Инокулированные культуры клеток инкубируют в течение 1 – 2 ч при 37 °C при периодическом покачивании. Если используются открытые сосуды для культуры клеток, такие как планшеты для культуры клеток, инкубацию проводят во влажном инкубаторе с 5 % CO2.

д) Отбрасывают инокулум и промывают монослои клеток три раза средой для культуры клеток, содержащей трипсин.

е) Во все сосуды добавляют соответствующий объем поддерживающей среды для культуры клеток и инкубируют при 37 °C в течение 3 – 7 дней при периодическом изучении на предмет цитопатического действия (ЦПД). Если в конце периода инкубации ЦПД не наблюдается, сосуд с культурой клеток можно заморозить при минус 70 °C или при более низкой температуре, оттаять и сделать слепой пассаж. Если ЦПД наблюдается, то аликвоту среды для культуры клеток можно испытать на гемагглютинирующие вирусы или с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ) на предмет консервативных генов вируса гриппа, таких как нуклеопротеин или матрикс, и эту жидкость можно забрать и использовать как инокулят для подтверждения с помощью метода флюоресцирующих антител. Для этого можно произвести посев на покровные стекла (пробирки Лейтона, 24-луночный планшет для культуры клеток) или стекла с камерами с монослоями MDCK (или другими соответствующими клетками). Проводят выделение. В некоторых случаях может потребоваться десятикратное разведение вируса из культуры клеток для достижения соответствующего ЦПД на покровных стеклах. Подтипы вируса гриппа можно определить с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибирования нейраминидизы (NI), или с помощью ПЦР ОТ с праймерами, валидированными для чувствительной и специфичной амплификации отдельных генов HA и NA. Необходимо провести валидацию с использованием эндемичных циркулирующих в регионе штаммов, чтобы обеспечить пригодность этих методов, поскольку эндемичные штаммы ВГАС могут генетически различаться в разных регионах.

* + 1. **Посев в куриные эмбрионы**

а) Используют яйца с эмбрионами возраста 9 – 11 дней.

б) В аллантоисную и амниотическую полости вводят 0,1 – 0,3 мл инокулума; многие лаборатории проводят посев только в аллантоисную полость, при сходной чувствительности. Обычно один образец высевают в 3 ­– 4 яйца.

в) Яйца инкубируют при 35 – 37 °C в течение до 5 дней при освещении в течение дня. Яйца с эмбрионами, погибшими в течение 24 ч после посева, отбрасывают (считается, что их гибель связана с травмой, полученной в процессе инокуляции).

г) Яйца с эмбрионами, погибшими более чем через 24 ч после инокуляции, охлаждают. В конце периода инкубации из яиц с погибшими эмбрионами и из яиц с живыми эмбрионами забирают амниотическую и аллантоисную жидкость. Все материалы яиц считаются потенциально заразными, и с ними следует работать соответствующим образом, чтобы не допустить контакта работников лаборатории с ВГА-С.

д) Жидкости центрифугируют при 1500 – 1900 *g* в течение 10 – 20 мин при температуре 4 °C. Надосадочную жидкость переносят в другую пробирку для изучения.

е) Жидкости оценивают на предмет наличия ВГА-С на основе реакции гемагглютинации (РГА).

ж) Делают новые пассажи (1 – 2) жидкостей, не продемонстрировавших гемагглютинирующей активности (отрицательных в отношении ВГА-С), в яйца или линии клеток. Выделение может быть лучшим, если сделать десятикратные разведения жидкости в среде для культуры клеток.

* + 1. **Тест на гемагглютинацию**

а) Готовят 0,5 % суспензию эритроцитов из крови индюков или цыплят. Цельную кровь переносят в пробирку и добавляют ФСБ. Например, 10 – 20 мл цельной крови в центрифужной пробирке объемом 50 мл, к которой для заполнения пробирки добавлен ФСБ. Осторожно переворачивают пробирку несколько раз, чтобы промыть эритроциты. Центрифугируют при 800 g в течение 10 мин в центрифуге с охлаждением. Отсасывают ФСБ и лейкоцитарную пленку (слой лейкоцитов) из пробирки. Наполняют пробирку свежим ФСБ и тщательно ресуспендируют эритроциты. Повторяют цикл промывки и центрифугирования еще два раза. По завершении промывки, вносят в ФСБ количество эритроцитов, достаточное для получения 0,5 % раствора. Некоторые штаммы вируса в большей или меньшей степени лучшую агглютинацию дают на крови индюков, а не цыплят. Поэтому может потребоваться выбрать тип эритроцитов на основе штаммов, циркулирующих в данном регионе. Промытые эритроциты и 0,5 % суспензию эритроцитов можно хранить при температуре 4 °C в течение до 1 недели. Если наблюдается гемолиз, пробу отбраковывают.

б) Помещают 50 мкл ФСБ в лунки 8 – 12 одного ряда 96-луночного микротитрационного планшета с V- или U-образным дном для каждого неизвестного вируса. Еще один ряд лунок должен служить положительным контролем.

в) В первую лунку каждого ряда вносят 50 мкл неразведенного изолята.

г) Делают серийные разведения изолята с помощью микропипетки, установленной на объем 50 мкл. Полученные разведения составят от 1/2 (лунка 1) до 1/2048 (лунка 11). Лунка 12 содержит только ФСБ и служит клеточным контролем.

д) В каждую лунку вносят 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов и осторожно встряхивают планшет для размешивания.

Примечание – В процессе внесения эритроциты должны быть хорошо суспендированы.

е) Планшет накрывают пленкой и инкубируют при комнатной температуре (24 °C) или при 4 °C до появления отчетливого сгустка (30 – 60 мин) в лунке отрицательного контроля.

ж) В лунках с полной гемагглютинацией (положительный результат РГА, наличие ВГА-С) эритроциты расположены по всей лунке в виде «пленки». Лунки с отчетливым сгустком эритроцитов на дне лунки не имеют гемагглютинирующей активности (отсутствие ВГА-С). Неполная гемагглютинация выглядит как частичный сгусток, характеризующийся размытыми краями или «пончикообразный». В случае сомнений, при интерпретации результата как отрицательного результата или как неполного ингибирования, наклоните микротитрационный планшет под углом около 45 градусов на 20 ­– 30 секунд и посмотрите на текущую жидкость: в лунках, где нет гемагглютинации, есть капля прозрачной жидкости. В лунках с частичным ингибированием такой жидкости нет.

**6.3 Типирование изолятов вируса гриппа A свиней (ВГА-С)**

* + 1. **Реакция торможения гемагглютинации**

а) Эталонные гемагглютинирующие (ГА) антигены (H1, H3 и др.) разводят до концентрации 8 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) на 50 мкл (4 ГАЕ/25 мкл) в 0,01 М ФСБ, pH 7,2 – 7,4. Эталонные антигены должны соответствовать штаммам, активно циркулирующим в районе, где содержатся свиньи. Указания в отношении эталонных антигенов можно получить в референтной лаборатории МЭБ для данного региона.

б) Стандартизируют неизвестные вирусы гриппа A таким образом, чтобы они содержали 8 ГАЕ в 50 мкл.

в) Проводят обратное титрование (РГА тест) для всех неизвестных изолятов и подтипов антигенов H для обеспечения надлежащего значения ГАЕ. Обратное титрование проводится в соответствии с описанием процедуры РГА, за исключением того, что вместо одиннадцати разведений в лунках используется шесть.

г) Каждую эталонную сыворотку (специфичную для отдельного подтипа ГА и представляющую активно циркулирующие в регионе вирусы) обрабатывают RDE (рецептороразрушающий фермент); добавляют 50 мкл сыворотки к 200 мкл RDE (разведение 1/10 в физиологическом растворе с сульфатом магния и хлоридом кальция, что соответствует 100 единицам на 1 мл). Инкубируют в течение ночи (12 – 18 ч) на водяной бане при 37 °C. Добавляют 150 мкл 2,5 % раствора цитрата натрия и нагревают для инактивации при 56 °C в течение 30 мин. Объединяют 200 мкл обработанного образца и 25 мкл ФСБ.

Примечание – Обработка RDE рекомендуется, поскольку она снижает неспецифические реакции и способствует идентификации изолятов H1N2 H3N2.

д) Естественные агглютинины из сывороток удаляют путем обработки разведенной сыворотки 0,1 мл упакованных отмытых эритроцитов на 1 мл разведенной сыворотки. Инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре, периодически помешивая для поддержания эритроцитов в суспендированном состоянии. Обработанную сыворотку центрифугируют при 800 g в течение 10 мин и забирают надосадочную жидкость.

е) Помещают 25 мкл стандартизированного антигена (неизвестный изолят или антиген положительного контроля) в три лунки 96-луночного микротитрационного планшета с V- или U-образным дном. Вносят 50 мкл ФСБ в несколько лунок, которые будут служить контролем эритроцитов.

Примечание – Вместо 25 мкл стандартизированного антигена можно использовать 25 мкл ФСБ.

ж) Добавляют 25 мкл соответствующей эталонной сыворотки в первую лунку для исследуемого подтипа H. Делают серийные разведения антисыворотки в объеме 25 мкл в лунках антигена, установив пипетку на объем 25 мкл. Эту процедуру повторяют для каждого исследуемого подтипа H.

Примечание – Если на этапе vi использовано 25 мкл ФСБ вместо 25 мкл стандартизированного антигена, добавляют 25 мкл стандартизированного антигена в каждую лунку, содержащую эталонную сыворотку.

и) Планшет (-ы) накрывают и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 – 30 мин.

к) В каждую лунку добавляют 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов и осторожно встряхивают/взбалтывают планшеты для размешивания. В процессе внесения эритроциты поддерживают в суспендированном состоянии.

л) Накрывают планшет (-ы) пленкой и инкубируют при комнатной температуре (24 °C) или 4 °C до образования отчетливого сгустка в лунках положительного контроля (обычно 30 – 60 мин). Примерно через 20 мин инкубации осматривают планшеты на предмет признаков гемагглютинации, поскольку некоторые изоляты могут начать элюировать (отделяться от эритроцитов) через 30 мин.

м) Результаты интерпретируют, как для РГА. Образец считается положительным в отношении специфического подтипа H, если гемагглютинация подавляется. Испытание считается действительным, если положительный эталонный антиген и его гомологичная антисыворотка демонстрируют ожидаемый титр РТГА и обратное титрование каждого антигена (неизвестного и положительного контроля) дает 4 или 8 ГАЕ. Если эти условия не выполняются, испытание следует повторить.

н) Если эритроциты в лунках клеточного контроля не осаждаются с образованием хорошо выраженного сгустка, в качестве возможных причин проверяют следующие: отклонения в составе ФСБ, слишком сильное испарение из планшетов, эритроциты слишком старые, отклонения в концентрации эритроцитов.

**6.3.2 Тест ингибирования нейраминидазы**

Надежная идентификация подтипа на основе реакции ингибирования нейраминидазы не входит в область деятельности многих лабораторий. Референтные лаборатории могут дать консультации в отношении N-типирования изолятов.

**6.4 Тест иммунной флюоресценции**

* + 1. **Процедура испытания**

а) Настоящий метод можно использовать для срезов ткани, покровных/предметных стекол или 96-луночных планшетов с инфицированными монослоями клеток. Во всех процедурах окрашивания должен использоваться положительный и отрицательный контроль.

Настоящий метод сильно зависит от использования эталонных реактивов, представляющих вирусы, циркулирующие в данном регионе, и от обученного интерпретации результатов персонала, способного отличить положительный результат от фонового окрашивания (специфичность). Настоящий метод обнаружения вируса имеет меньшую чувствительность по сравнению с другими существующими методами, такими как ПЦР.

б) Инокулированные клетки инкубируют в течение соответствующего периода времени для того, чтобы обеспечить продуктивное инфицирование вирусом 10 – 25 % клеток. Покровное или предметное стекло однократно промывают ФСБ, помещают в 100 % ацетон на 5 – 10 мин и сушат на воздухе. Ацетон следует использовать в вытяжном шкафу.

в) Готовят срезы замороженных тканей на предметных стеклах. Фиксируют стекла в ацетоне в течение 5­ – 10 мин и сушат на воздухе.

г) Наносят конъюгат (меченые флюоресцеином антитела к ВГА-С) и инкубируют во влажной камере при 37 °C в течение 30 мин. Рекомендуется включать в состав конъюгата эванс голубой для контрастного окрашивания.

д) Промывают ФСБ, pH 7,2, оставляют на 5 – 10 мин в свежем ФСБ, промывают дистиллированной водой и сушат на воздухе.

е) Покровные стекла помещают на предметные стекла клетками вниз в жидкость для монтирования. Удаляют резиновую прокладку со стекла с камерами и добавляют жидкость для монтирования, после чего накрывают покровным стеклом. Жидкость для монтирования, а затем покровное стекло помещают на срезы ткани на предметном стекле. Если используются 96-луночные планшеты, среда для монтирования и покровные стекла не требуются.

ж) Окрашенные стекла изучают в затемненной комнате с использованием УФ-микроскопа. Клетки, инфицированные ВГА-С, обнаруживаются по наличию яркой светло-зеленой флюоресценции. Рекомендуется, чтобы персонал, изучающий стекла, получил обучение в отношении интерпретации результатов окрашивания стекол флюоресцеином, поскольку такая интерпретация представляет трудности. При изучении неизвестных материалов следует использовать стекла положительного и отрицательного контроля для подтверждения того, что процедура испытания работает и для использования в качестве основы для дифференциации положительного (ВГА-С) результата окрашивания и отрицательного (фонового) окрашивания. Важно использовать антитела, способные распознавать все возможные вирусы, циркулирующие в данном районе (например, пан-антитела к нуклеопротеину гриппа А).

**6.5 Иммуногистохимический метод**

**6.5.1 Процедура испытания**

а) Делают срезы фиксированного формалином заключенного в парафин легкого толщиной 4 мкм и помещают их на покрытые поли-L-лизином предметные стекла (можно использовать готовые стекла). Во все исследования должны быть включены ткани положительного и отрицательного контроля.

б) Стекла нагревают при 60 °C в течение 15 мин, удаляют парафин и переводят в водную фазу, погружая в этанол с уменьшающейся концентрацией, а затем в дистиллированную воду.

в) Обрабатывают образцы 3 % перекисью водорода в течение 10 мин и два раза промывают дистиллированной водой.

г) Обрабатывают образцы 0,05 % протеазой в течение 2 мин и промывают два раза по 2 мин в 0,1 М буфере Трис/ФСБ, pH 7,2, при комнатной температуре.

д) На каждое стекло наносят первичные мышиные анти-ВГА-С моноклональные антитела (направленные против вирусного нуклеопротеина) и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч или ночи при 4 °C. Стекла промывают буфером Трис/ФСБ.

е) Наносят вторичные антитела (биотинилированные козьи антимышиные антитела) и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Промывают буфером Трис/ФСБ.

ж) Наносят третичное антитело (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой) на 10 минут при комнатной температуре. Промывают буфером Трис/ФСБ.

и) Наносят раствор диаминобензидина тетрагидрохлорида на 5 мин при комнатной температуре. Два раза промывают дистиллированной водой.

к) Производят контрастное окрашивание гематоксилином Гилла в течение 10 – 30 секунд, промывают в воде в течение 2 мин, обезвоживают, просветляют и накрывают покровными стеклами.

л) Инфицированные ВГА-С ткани обнаруживаются по коричневому окрашиванию бронхиолярного эпителия и пневмоцитов.

**6.6 Энзимно-связанные иммуносорбентные анализы с захватом антигена**

Твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) по методу «антигенной ловушки» типа A и мембранный иммуноферментный анализ являются коммерчески доступными методами детекции вирусов гриппа человека и животных. Эти типы методов используются для выявления ВГА-С в ткани легких и мазках из полости носа. Эти методы имеют тенденцию к меньшей чувствительности по сравнению с другими методами, такими как ПЦР.

**6.7** **Полимеразная цепная реакция**

Высоко консервативные белок матрикса и нуклеопротеин являются наилучшими мишенями для скрининга на инфицирование ВГА-С с помощью ПЦР ОТ. После выявления пандемического вируса H1N1, молекулярный анализ основанный на ПЦР в формате реального времени для матрикса птичьего гриппа, был адаптирован для использования у свиней.

Примечание – Модификации метода варьируют в разных странах, и за информацией о наиболее подходящем методе ПЦР матрикса можно обратиться в референтную лабораторию по гриппу свиней.

Метод ПЦР ОТ в формате реального времени для ВГА-С имеет мишенью ген матрикса (M) вирусов гриппа A. Набор праймер/зонд матрикса относится к квазимножественной ПЦР ОТ в формате реального времени, использующей один прямой праймер, зонд и два обратных праймера.

ПЦР ОТ в формате реального времени представляет собой одноэтапную процедуру. Специфические праймеры позволяют амплифицировать целевой участок (см. таблицу 2). Непродлеваемые флюорогенные гидролитические зонды позволяют измерить целевой ПЦР-продукт, образующийся в каждом цикле ПЦР. Зонды метятся на 5’-конце репортерным красителем, а на 3’-конце – нефлюоресцентным гасителем. После гибридизации зонда с целевой последовательностью 5’-нуклеазная активность Taq полимеразы приводит к гидролизу зонда и отделению гасителя от репортерного красителя. Это приводит к флюоресценции отделенного репортерного красителя, которая обнаруживается спектрофотометрически и регистрируется. Регистрируется количество флюоресценции, и количество циклов детекции пропорционально количеству целевой матрицы в образцах.

Для этой процедуры критически важно иметь отдельные помещения для приготовления и оборудование для экстракции нуклеиновых кислот, трансфера РНК и приготовления исходной смеси. Требуется «чистое» пространство для приготовления реактивов, используемых для ПЦР, cвободное от амплифицированной c-ДНК или РКН образца.

**Таблица 2 – Последовательности гидролитического**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Специфичность** | **Описание** | **Последовательность** |
|  | Праймер M+25\* 5' | 5'-AgA TgA gTC TTC TAA CCg Agg TCg-3' |
| Матрица (любой вирус гриппа А) | Зонд M+64\* | 5'-FAM-TCA ggC CCC CTC AAA gCC gA-BHQ-1-3' |
|  | Праймер M-124\* 3' | 5'-TgC AAA AAC ATC TTC AAg TCT CTg-3' |
|  | Праймер M-124\* SIV 3'\*\* | 5'-TgC AAA gAC ACT TTC CAg TCT CTg-3' |
| \*Относится к расположению нуклеотида, где 5’– конец зонда или праймера отжигается на геном.  \*\*Праймер для детекции матрикса пандемического H1N1 2009 г. | | |

а) Экстрагируют нуклеиновую кислоту из образца. Для подтверждения успешности экстрагирования, необходимо использовать положительный и отрицательный контроль экстрагирования (ПКЭ и ОКЭ, соответственно).

б) Готовят исходную смесь для ПЦР ОТ в «чистом» помещении для ПЦР (таблица 2).

в) Помещают аликвоты 17 мкл реакционной смеси в каждую лунку 96-луночного планшета. Переносят 8 мкл матричной РНК для каждой реакции в соответствующее помещение для трансфера РНК. При использовании 96- луночного планшета, для защиты дна планшета от царапин, отпечатков пальцев и прилипания посторонних частиц, что может повлиять на оптическую систему и изменить результат флюоресценции, используют подставку.

1. Для проверки того, что ПЦР и экстрагирование РНК успешны, в цикл ПЦР необходимо включить следующие контроли: положительный контроль экстрагирования (ПКЭ), отрицательный контроль экстрагирования (ОКЭ), положительный контроль амплификации (ПКА) и отрицательный контроль амплификации (ОКА). ПКА разводят в каждой диагностической лаборатории, и он должен иметь значение Ct в диапазоне 21 – 29, чтобы цикл был действительным.

г) Образцы помещают в термоциклер и включают его при соответствующих параметрах.

д) Анализируют результаты. Цикл ПЦР будет действительным, если:

1. Значение Ct для ПКА составляет 21 – 29.
2. ПКЭ дал положительный результат.
3. ОКЭ и ОКА дали отрицательный результат.
4. Все образцы и контроли, продемонстрировавшие положительный результат, имеют «сигмоидную кривую».
5. Если вышеперечисленные условия не выполняются, исследование необходимо повторить.

**Таблица 3 – Пример исходной смеси для ПЦР ОТ в формате**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Компонент | Итоговая концентрация | Объем на реакцию (мкл) |
| H2O | - | 0.83 |
| 2 × буфер ПЦР ОТ | 1× | 12.5 |
| Праймер M+25 5’ (20 мкМ) | 200 нМ | 0.25 |
| Праймер M-124 3’ (20 мкМ) | 200 нМ | 0.25 |
| Праймер M-124 SIV 3’ (20 мкМ) | 200 нМ | 0.25 |
| 25 × смесь ферментов ПЦР ОТ | 1× | 1 |
| Зонд M+64 (6 мкМ) | 60 нМ | 0.25 |
| Усилитель детекции (15×) | 1× | 1,67 |
| Матрица | - | 8 |
| Общий реакционный объем | - | 25 |

**Таблица 4 – Примерные параметры**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Этап | Циклы | Операция | Время | Температура | |
| 1 | 1 |  | 10 минут | 45°C | |
| 2 | 1 |  | 10 минут | 95°C | |
| 3 | 45 | Денатурация | 1 секунда | 94°C | |
|  |  | Отжиг\* | 30 секунд | 60°C | |
|  |  | Элонгация | 15 секунд | 72°C | |
| Примечание – Подтип изолятов вируса может быть определен с использованием традиционных методов или ПЦР в формате реального времени, которая позволяет дифференцировать генетически различающиеся вирусы H1 от других известных штаммов (Chiapponi et al., 2012). Дифференциальная ПЦР в формате реального времени все чаще используется во многих регионах. Диагностческие образцы для матричной ПЦР можно субтипировать с использованием субтипирующей ПЦР. Образцы с высокими матричными CT могут не поддаваться детекции при субтипирующей ПЦР, и может потребоваться попытка выделения вируса до идентификации подтипа. Реактивы для скрининга и субтипирующей ПЦР имеются в продаже, лаборатории должны обеспечить возможность выявления циркулирующих в данном районе вирусов гриппа. Во многих случаях необходимо провести частичное или полное секвенирование одного или более генов ВГА-С (т.е. нейраминидазы, гемагглютинина), чтобы быть уверенными в подтипе выявленного вируса. Кроме того, для определения и мониторинга разнообразия вируса все чаше используется генотипирование вируса на основе секвенирования нескольких или всех генных сегментов. Методы следует валидировать для региона, в котором они должны применяться, с учетом изменчивости ВГА-С в мире.  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  \*Накопление флюоресценции | | | | |

Подтип изолятов вируса может быть определен с использованием традиционных методов или ПЦР в формате реального времени, которая позволяет дифференцировать генетически различающиеся вирусы H1 от других известных штаммов. Дифференциальная ПЦР в формате реального времени используются все чаще. Диагностческие образцы для матричной ПЦР можно субтипировать с использованием субтипирующей ПЦР. Образцы с высокими матричными CT могут не поддаваться детекции при субтипирующей ПЦР, и может потребоваться попытка выделения вируса до идентификации подтипа. Реактивы для скрининга и субтипирующей ПЦР имеются в продаже, но лаборатории должны обеспечить возможность выявления циркулирующих в данном районе вирусов гриппа. Во многих случаях необходимо провести частичное или полное секвенирование одного или более генов ВГА-С (т.е. нейраминидазы, гемагглютинина), чтобы быть уверенными в подтипе выявленного вируса. Кроме того, для определения и мониторинга разнообразия вируса все чаще используется генотипирование вируса на основе секвенирования нескольких или всех генных сегментов. Методы следует валидировать для региона, в котором они должны применяться, с учетом изменчивости ВГА-С в мире.

**7 Серологические тесты**

7.1 Основным серологическим методом для выявления антител к ВГА-С является РТГА, обладающая специфичностью в отношении подтипов. Эталонные антигены должны отражать циркулирующие в данном регионе вирусы и быть как можно более широко реактивными в отношении специфического подтипа. Исследование следует проводить на парных сыворотках, забранных с интервалом 10 – 21 день. Нарастание титра в четыре или более раза в период между забором первого и второго образца свидетельствует о недавнем инфицировании ВГА-С. Другими серологическими методами, которые не так часто используются, являются нейтрализация вируса, иммунодиффузия в агаровом геле и непрямая реакция иммунной флюоресценции. Твердофазный ИФА для выявления антител к ВГА-С описан в литературе.

**7.1 Тест на торможения гемагглютинации**

* + 1. **Процедура испытания**

а) Эталонные ГА антигены (H1, H3 и др.) разводят до концентрации 4 – 8 ГАЕ/25 мкл в 0,01 М ФСБ, pH 7,2.

б)Исследование для *H1N1:* Инактивированные сыворотки нагревают в течение 30 мин при 56 °C. Разводят 1/10 в ФСБ. Добавляют 0,1 мл упакованных отмытых эритроцитов к 1 мл инактивированной нагреванием разведенной сыворотки и размешивают. Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин при периодическом встряхивании каждые 10 – 15 мин. Центрифугируйте при 800 g в течение 10 мин при температуре 4 °C.

Примечание – Сыворотки можно обработать RDE и эритроцитами в качестве альтернативы инактивации нагреванием и обработке упакованными эритроцитами. Хотя использование RDE рекомендуется, могут быть региональные различия в отношении его использования для обработки сывороток в зависимости от специфичности сывороток для некоторых антигенов, используемых в РТГА.

в) Исследование для *H1N2* и *H3N2*: добавляют 50 мкл сыворотки к 200 мкл RDE (разведение 1/10 в физиологическом растворе с сульфатом магния и хлоридом кальция, что соответствует 100 единицам на 1 мл). Инкубируют в течение ночи (12 – 18 ч) на водяной бане при 37 °C. Добавляют 150 мкл 2,5 % раствора цитрата натрия и нагревают для инактивации при 56 °C в течение 30 мин. Объединяют 200 мкл обработанного образца и 25 мкл ФСБ. Добавляют 50 мкл 50 % эритроцитов. Встряхивают и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C. Центрифугируют при 800 g в течение 10 мин при температуре 4 °C.

г) Помещают 50 мкл обработанной сыворотки в две лунки 96-луночного планшета с V- или U-образным дном. Помещают 25 мкл обработанной сыворотки в две лунки, используемые как контроль сыворотки. Сыворотки положительного и отрицательного контроля обрабатывают так же, как и неизвестные сыворотки.

д) Помещают 25 мкл ФСБ в лунки контроля сыворотки и все пустые лунки, за исключением двух лунок, являющихся лунками клеточного контроля. Добавляют 50 мкл ФСБ в лунки клеточного контроля.

е) Делают серийные двойные разведения сыворотки в объемах 25 мкл на планшете и затем добавляют 25 мкл соответствующего антигена во все лунки, за исключением лунок контроля сыворотки и лунок клеточного контроля.

ж) Закрытые планшеты инкубируют при комнатной температуре (24 °C) или 4 °C в течение 30 – 60 мин.

к) Добавляют 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов в каждую лунку, встряхивают и инкубируют при комнатной температуре (24 °C) или 4 °C в течение 20 – 30 мин до образования отчетливого сгустка на дне лунок клеточного контроля. В процессе внесения поддерживают эритроциты в суспендированном состоянии.

л) Проводят РГА с использованием антигенов для РТГА перед и одновременно с проведением РТГА для проверки приемлемости концентраций антигенов.

Испытание действительно, если гемагглютинации не наблюдается в лунке контроля сыворотки, нет ингибирования гемагглютинации в отрицательной сыворотке, положительная сыворотка имеет ожидаемый титр РТГА и обратное титрование ГА дает значение 4 – 8 ГАЕ на 25 мкл.

**7.2 Иммуноферментный анализ**

Метод твердофазного ИФА для выявления антител (против ВГА-С) описан в [1], [2], и в продаже есть наборы для твердофазного ИФА.

**8 Требования к вакцинам**

**8.1 Краткая информация**

**8.1.1 Обоснование и предполагаемое использование препарата**

Инфекция ВГА-С может оказывать существенное экономическое воздействие на производителей в связи со снижением потребления корма в период болезни, что приводит к снижению прибавки массы тела, увеличению продолжительности периода до достижения продажных кондиций и понижению эффективности кормления. В регионах, где практикуется вакцинация, вакцина используется для снижения экономического воздействия заболевания путем снижения тяжести и продолжительности клинических признаков. Вакцины могут снижать уровень выделения вируса из организма и продолжительность выделения вируса. Снижение количества выделенного вируса и продолжительности выделения вируса может быть важным для снижения передачи вируса при минимизации риска экспозиции для свиней и людей.

**8.2 Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам**

**8.2.1 Характеристики посевного вируса**

8.2.1.1 Биологические характеристики

Штаммы, используемые для производства вакцины, должны быть антигенно близкими к штаммам ВГА-С, циркулирующим в полевых условиях. Для выбора можно использовать реакцию торможения гемагглютинации, реакцию нейтрализации, демонстрирующие перекрестную реактивность между антисыворотками от свиней, вакцинированных штаммами, являющимися кандидатами для производства вакцины, и штаммами, выделенными в полевых условиях.

Информация о вакцинном вирусе должна быть хорошо задокументирована, включая источник и историю пассажей вируса. Должны быть установлены все отличительные характеристики, такие как подтипы гемагглютинина и нейраминидазы. Для определения подтипов H и N можно использовать реакцию торможения гемагглютинации и ингибирование нейраминидазы специфичными для подтипов антисыворотками или ПЦР ОТ в формате реального времени и секвенирование. Можно нейтрализовать аликвоты исходного вакцинного вируса (ИВВ) специфической антисывороткой, т.е. антисывороткой против H1 или H3 ВГА-С, а затем инокулировать в аллантоисную полость 10-дневных куриных эмбрионов или восприимчивые клеточные линии, такие как клеточная линия MDCK. Аллантоисную жидкость или надосадочную жидкость культуры клеток забирают через 72 – 96 ч после инокуляции и изучают на предмет активности ГА. Принадлежность к данному подтипу определяется по отсутствию активности ГА в нейтрализованном посевном материале и наличию активности ГА в не нейтрализованном посевном материале. Должны быть подтверждены значительные антигенные отличия данного штамма, отличающие его от других представителей этого подтипа, которые могут благоприятно влиять на его использование для производства вакцины.

Следует изучить факторы, которые могут привести к нестабильности при производстве, такие как репликация на необычной клеточной линии. Если при производстве делается пять пассажей исходного вакцинного вируса, может потребоваться секвенирование генов H и N для максимального пассажа, чтобы подтвердить стабильность посевного материала вируса.

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

Должна быть продемонстрирована чистота вакцинного вируса и клеток, использованных для производства вакцины. ИВВ не должен содержать посторонних микроорганизмов, бактерий или микоплазм, и это должно быть подтверждено с использованием методов с известной чувствительностью для выявления этих микроорганизмов. Исследуемые аликвоты должны быть репрезентативными для титра, достаточного для производства вакцины, но не такими высокими, чтобы гипериммунная антисыворотка не могла нейтрализовать вакцинный вирус в испытании на чистоту. Вакцинный вирус нейтрализуется моноспецифической антисывороткой или моноклональными антителами против ВГА-С, и смесь вирус/антитело культивируется на нескольких типах монослоев клеточных линий. Делаются субпассажи культур с 7-дневными интервалами в течение в общей сложности не менее 14 дней, затем проводятся испытания на предмет цитопатогенных и гемадсорбирующих микроорганизмов.

**8.2.2 Способ изготовления**

8.2.2.1 Описание процедуры производства

Если продемонстрирована эффективность вакцины и предлагаемые условия производства считаются приемлемыми регуляторными органами, производство вакцины может быть одобрено. ВГА-С можно выращивать в куриных эмбрионах или в культуре клеток. Выбор способа культивирования зависит от степени адаптации вируса, роста на среде, скорости мутации и продуктивности вируса в специальной системе культивирования. Количество пассажей ИВВ для вакцин против ВГА-С должно быть ограничено пятью во избежание генетических/антигенных изменений. Обычно, крупномасштабные системы культивирования монослоев или суспензий клеток функционируют в условиях строго контролируемых температуры, асептических условий и установленных методов производства для обеспечения единообразия серий. Когда вирус достигает максимального титра, определяемого на основе ГА, ЦПД, реакции иммунной флюоресценции или другого одобренного метода, вирус очищают, фильтруют и инактивируют. Успешно используется несколько веществ для инактивации, включая формалин или бинарный этиленимин. Обычно добавляют адъювант для усиления иммунной реакции.

8.2.2.2 Требования к субстратам и средам

Клетки изучают на предмет посторонних вирусов, которые могли инфицировать клетки или посевной материал при предшествующих пассажах. Возможные контаминанты включают вирус вирусной диареи крупного рогатого скота, реовирус, вирус бешенства, вирус болезни Ауески (ложное бешенство), вирус инфекционного гастроэнтерита, респираторный коронавирус свиней, парвовирус свиней, аденовирус свиней, вирус гемагглютинирующего энцефаломиелита, ротавирус свиней, цирковирус свиней и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Клеточные линии, на которых исследуется вакцинный вирус, включают: клеточную линию почек африканской зеленой мартышки (Vero) (бешенство и реовирусы), клеточную линию свиней, клеточную линию из клеток, используемых для размножения вакцинного вируса, если она не происходит от свиней, и клеточные линии других видов животных, на которых проводятся пассажи вакцинного вируса. Рекомендуется клеточная линия, высоко пермиссивная для вируса вирусной диареи крупного рогатого скота типов 1 и 2. Вирус вирусной диареи крупного рогатого скота является потенциальным контаминантом, внедряющимся в результате использования сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота в системах культивирования клеток.

8.2.2.3 Внутрипроизводственный контроль

Клеточные культуры следует исследовать макроскопически на предмет отклонений или признаков контаминации и отбраковывать в случае неудовлетворительных результатов. Партия вируса готова, когда ЦПД достигает 80 – 90 %. Концентрацию вируса можно оценить с использованием антигенной массы или анализа инфекционности.

8.2.2.4 Испытания партии готового препарата

Для штаммов-кандидатов для использования в вакцине должны быть продемонстрированы чистота, безопасность, активность и эффективность.

а) Стерильность и чистота

В ходе производства партии как инактивированного, так и живого вакцинного вируса должны быть испытаны на контаминацию бактериями, микоплазмами и грибами, и результаты затем подтверждают путем анализа готового продукта.

б) Безопасность

Должно быть проведено исследование кинетики инактивации с использованием утвержденного вещества для инактивации для титра вируса, большего, чем максимальный производственный титр, и выращенного с использованием утвержденного производственного метода. Это исследование должно продемонстрировать, что метод инактивации достаточный для обеспечения полной инактивации вируса. В ходе инактивации с регулярными интервалами забирают образцы, которые затем высевают в восприимчивые клеточные линии или в аллантоисную полость куриных эмбрионов, при этом должна наблюдаться линейная и полная потеря титра к концу процесса инактивации. После инактивации, он должен составлять менее одной инфекционной частицы на 104 л жидкости.

в) Активность партии

В ходе производства определяют содержание антигена для подтверждения того, что достигнут минимальный общий титр. Содержание антигена обычно определяют до инактивации и перед дальнейшей обработкой. Методы, позволяющие определить содержание антигена в конечном продукте, включают твердофазный ИФА для определения относительной активности, ГА и РТГА. Необходимо подтвердить чувствительность, специфичность, воспроизводимость и надежность этих методов.

Анализ активности, проводимый во время изучения минимальной защиты антигена, должен использоваться для оценки новых серий при выпуске. Анализ должен быть специфичным и воспроизводимым. Он должен позволять надежно выявлять вакцины, которые имеют недостаточную активность. Если в серологических исследованиях используются не свиньи, а лабораторные животные, сначала необходимо продемонстрировать, что вакцинация лабораторных животных приводит к специфичной, чувствительной, дозозависимой реакции, определяемой при анализе активности и коррелирующей с защитой у свиней.

**8.2.3 Требования к регистрации**

* + - 1. Требования безопасности

а) Безопасность у целевых и нецелевых животных

Образцы готового продукта инактивированной вакцины в конечной упаковке должны испытываться на безопасность у молодых мышей. В целом, здоровые поросята в возрасте отъема или более старшем и супоросные свиноматки на любом сроке гестации могут быть безопасно вакцинированы инактивированными вакцинами против ВГА-С. Конечный продукт можно оценить на животном-хозяине, используя двух животных минимального возраста, рекомендованного для применения, в соответствии с инструкциями, указанными на этикетке; животных наблюдают в течение 21 дня. Рекомендуются и полевые исследования безопасности, проведенные на вакцинированных животных, по крайней мере в трех разных географических регионах, при не менее чем 300 животных в каждой регионе.

б) Возврат к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин

Возврат к вирулентности для живых вирусных вакцин часто демонстрируют путем обратных пассажей у восприимчивых видов животных. Вирус выделяют от вакцинированных животных, затем выделенный вирус используют для инокуляции других животных. Последовательные пассажи у животных должны показать, что животные остаются клинически здоровыми и не имеют типичных признаков ВГАС.

в) Экологические соображения

Инактивированные вакцины против ВГА-С не несут особого риска для пользователя, хотя случайное введение себе может привести к нежелательной реакции, вызванной адъювантом и вторичными компонентами вакцины. Модифицированные живые вирусные вакцины могут представлять опасность для пользователя в зависимости от уровня инактивации вируса и восприимчивости людей к адаптированному для свиней вирусу.

Консервантов следует по возможности избегать, а когда это невозможно, следует ограничиться наименьшей возможной концентрацией. Наиболее часто используемым консервантом является тимеросол, в итоговой концентрации не более 0,01 % (1/10000). В вакцинах против ВГА-С можно в качестве консервантов использовать антибиотики, но есть ограничения по типу и концентрации. Ограничения касаются и остаточных антибиотиков из сред для культуры клеток, которые могут присутствовать в конечном продукте. Например, общее количество консервантов и остаточного гентамицина не должно превышать 30 мкг на 1 мл вакцины.

Флаконы с вакциной, шприцы и иглы могут представлять собой опасность для окружающей среды в случае вакцин с адъювантами или консервантами и для аттенуированных живых вакцин. Указания по утилизации должны быть приведены на упаковке вакцины и основаны на текущих экологических нормативах в стране использования.

8.2.3.2 Требования к эффективности

а) Для животноводства

Степень защиты, обеспечиваемая вакциной, определяется в исследовании с вакцинацией/заражением, проводимом у свиней с использованием гомологичных и геетрологичных штаммов для заражения. Свиньи, используемые в исследовании вакцинации/заражения, не должны иметь антител против ВГА-С в начале эксперимента. Исследования вакцинации/заражения должны проводиться с использованием вируса, полученного с помощью предлагаемого метода производства при максимальном допустимом уровне пассажа и с использованием свиней минимального рекомендованного возраста, указанного в информации к препарату. Сначала получают партии, содержащие разные количества вирусного антигена. Исследуемая серия, содержащая наименьшее количество антигена, продемонстрировавшее защиту, становится стандартом, относительно которого изучаются производственные серии в будущем. Самым важным критерием для оценки групп лечения в слепых исследованиях является статистически значимое снижение вирусной нагрузки (титра и продолжительности выделения вируса) в дыхательных путях вакцинированных свиней. Различия в области клинических данных и поражений легких находятся и среди критериев, используемых для определения успешности испытания. Если для определения активности каждой производственной партии вакцины должны использоваться методы *in vivo* или *in vitro*, такие исследования должны проводиться одновременно с изучением минимального количества антигена для определения критериев для выпуска. Имеются комбинированные вакцины, содержащие более одного штамма ВГА-С. Эффективность разных компонентов этих вакцин, должна быть установлена независимо, а затем в виде комбинации в случае взаимодействия между разными антигенами. Продолжительность иммунитета и рекомендованная частота вакцинации для вакцины должны определяться до регистрации продукта. Сначала такую информацию получают непосредственно с использованием исследований по вакцинации/заражению животных-хозяев. Период, в течение которого продемонстрирована защита, определенная по способности вакцины предотвращать заражение в действительном испытании, может быть включен в информацию о препарате. После проведения соответствующего анализа активности, если дрейф антигенов требует замены штаммов в пределах вакцины, штаммы того же подтипа могут быть оценены как у животного-хозяина, так и у модельного лабораторного животного, для которого установлена корреляция. Другие значимые факторы включают адъювант и дозу антигена. Эффективность вакцины должна всегда оцениваться у свиней.

Если вакцина должна использоваться у свиней, предназначенных для рынка для потребления человеком, срок ожидания, соответствующий использованному адъюванту (обычно 21 день), должен быть установлен на основе таких методов, как гистопатологическое исследование, результаты которого должны быть представлены в соответствующие регуляторные органы по безопасности продуктов питания.

б) Для борьбы и искоренения заболевания

Здесь действуют те же принципы, что и для использования животноводческой продукции. Реакция антител у вакцинированных животных может не отличаться от таковой у животных, заразившихся вирусом в поле, поэтому вакцинированные животные должны быть точно выявлены, если серологические методы будут использоваться вместе с соответствующими клиническими признаками для оценки экспозиции вируса с поле.

8.2.3.3 Стабильность

Вакцины должны храниться при минимальной экспозиции на свету при температуре 4 °C ± 2 °C, или как указано соответствующими регуляторными органами. Срок годности должен быть определен путем проведения утвержденного испытания на активность в течение предлагаемого срока годности.

***Библиография***

[1] BARBÉ F., LABARQUE G., PENSAERT M. & VAN REETH K. (2009). Эффективность коммерческого иммуноферментного анализа на антитела к вирусам свиного гриппа H1N1 и H3N2 у свиней, экспериментально зараженных вирусами европейского гриппа. *Журнал ветеринарных диагностических исследований,* **21,** 88-96.

[2] CIACCI-ZANELLA J.R., VINCENT A.L., PRICKETT J.R., ZIMMERMAN S.M. & ZIMMERMAN J.J. (2010). Выявление антител против нуклеопротеина гриппа А у свиней с помощью коммерческого иммуносорбентного анализа, блокирующего эпитопы гриппа, разработанного для птичьих видов. *Журнал ветеринарных диагностических исследований,* **22,** 3-9.

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

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** грипп, 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 нормативных технических документов** | **Сопбеков А.Н.** |
| **Ведущий специалист Департамента разработки нормативных технических документов** | **Нығыметуллақызы Ә.** |