*Проект*

*Изображение государственного Герба Республики Казахстан*

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Птица сельскохозяйственная**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ГАМБОРА**

**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 3.3.12

**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**

**Птица сельскохозяйственная**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ГАМБОРА**

**Основные положения**

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

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной диагностики болезни Гамбора у птицы сельскохозяйственной.

Вирус инфекционной бурсальной болезни (вирус ИББ, род Avibirnavirus, семейство Birnaviridae) инфицирует кур, индеек, уток, цесарок и страусов, но клинические признаки проявляются только у кур. Тяжелая форма болезни у 3 – 6- недельных птиц связана с высокой смертностью, а более легкая или бессимптомная форма болезни типична для птиц более младшего возраста. Вирус инфекционной бурсальной болезни вызывает истощение лимфоидной ткани в бурсе Фабрициуса. Это может привести к значительному угнетению гуморального ответа антител и, следовательно, возникновению вторичных инфекций. Выделяют 2 серотипа инфекционной бурсальной болезни: серотип 1 и серотип 2. Клиническая болезнь связана только с серотипом 1, и все коммерческие вакцины производятся против этого серотипа. Некоторые антигенные варианты вируса ИББ серотипа 1 требуют использования специальных вакцин для обеспечения максимальной защиты.

Клиническую болезнь по причине инфицирования вирусом ИББ, известную как болезнь Гамборо, обычно диагностируют путем описания характерных признаков и паталогоанатомических поражений. Субклиническую инфекцию вирусом ИББ можно подтвердить в лаборатории путем демонстрации ответа гуморального иммунитета не вакцинированных цыплят или путем обнаружения вирусного антигена или вирусного генома в тканях. Можно провести гистологическое исследование бурсы.

**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;

ИДАГ – иммунодиффузия в агаровом геле;

ИФА ЗА – иммуноферментный анализ с захватом антигена;

ОТ ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

*Проект, редакция 1*

**4 Общие положения**

**4.1 Идентификация возбудителя**

Выделение вируса ИББ не является рутинной диагностической процедурой. Для этой цели можно использовать отрицательных на специфические антитела цыплят и культуры клеток или яйца с эмбрионами из отрицательных на специфические антитела источников. Может возникнуть сложность при использовании последних двух систем, поскольку вирус неохотно к ним адаптируется. Идентичность выделенного вируса подтверждается с помощью реакции вирус нейтрализации (VN).

Вирусные антигены можно обнаружить в бурсе Фабрициуса перед выработкой антител к вирусу ИББ, это способствует диагностике на ранней стадии. В реакции иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) гомогенат бурсы используют в качестве антигена против известной положительной антисыворотки. Еще одним способом демонстрации антигенов вируса ИББ в гомогенатах бурсы является твердофазный иммуносорбентный анализ с захватом антигена (ELISAs), который проводят на планшетах, сенсибилизированных специфическими для вируса ИББ антителами. Наличие антигенов вируса ИББ можно подтвердить путем иммунного окрашивания инфицированных тканей, используя куриную специфическую антисыворотку к вирусу ИББ.

Для обнаружения вирусной РНК можно провести полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

**4.2 Характеристика штаммов**

Штаммы вируса ИББ можно определить путем патотипирования в отрицательных на специфические антитела цыплятах, путем скрининга антигенов в перекрестных реакциях вирус нейтрализации, или с помощью тестов, основанных на моноклональных антителах, путем определения нуклеотидной последовательности продуктов амплификации ОТ-ПЦР, полученных из обоих сегментов генома вируса ИББ. Тестирования должны проводиться в специализированных лабораториях и должны включать набор референтных штаммов для контроля.

**4.3 Серологическое тестирование**

Можно провести реакцию иммунодиффузии в агаровом геле, реакцию вирус нейтрализации и твердофазный иммуносорбентный анализ. Инфекция быстро распространяется в пределах стада. Достаточно протестировать небольшой процент стада на наличие антител. Если положительные реакции обнаруживаются у невакцинированных птиц, все стадо считается инфицированным.

**4.4 Требования к вакцинам и диагностическим биологическим препаратам**

Доступны живые аттенуированные вакцины, инактивированные (убитые) вакцины, живые рекомбинантные вакцины, экспрессирующие капсидный антиген (VP2) вируса ИББ и иммунокомплексные вакцины (Icx). Для активной иммунизации молодых кур используют как живые аттенуированные, так и рекомбинантные или иммунокомплексные вакцины. В качестве дополнительного способа можно обеспечить цыплят пассивным иммунитетом путем вакцинации родителей сочетанием живой и инаткивированной вакцин. Вакцинация племенного поголовья является важной процедурой.

Живые аттенуированные вакцины против вируса ИББ должны быть стабильными и не иметь тенденции возврата к вирулентности. Живые вакцины называют «слабая», «средняя» или «средняя плюс» («сильная») в соответствии с их возможностью (в восходящей степени):

а) реплицировать и вызывать лимфоцитарное истощение в бурсе;

б) преодолевать остаточные материнские антитела (MDA).

Слабые вакцины редко используют по отношению к бройлерам, но их широко используют для премирования родительского стада бройлеров до инокуляции инактивированной вакциной. Если в однодневном возрасте присутствуют материнские антитела – вакцинацию живой вакциной необходимо отложить до исчезновения антител у большинства особей в стаде. Оптимальный режим вакцинации определяется путем проведения серологического тестирования птицы для установления времени, когда материнские антитела достигли низкого уровня. Живые вакцины обычно вводят путем распыления или с питьевой водой.

Рекомбинантные и иммунокомплексные вакцины можно вводить автоматически посредством инъекции, либо in ovo на 18-й день инкубирования, или однодневным цыплятам даже при наличии материнских антител.

Убитые вакцины должны содержать большое количество антигена, чтобы быть эффективными. В основном их используют для стимулирования высоких универсальных уровней антител у родителей и, как следствие, у потомства. Их можно использовать и по отношению к молодым ценным птицам с материнскими антителами. Убитые вакцины производят в эмульсионно-масляном адъюванте и вводят путем инъекции. Данные вакцины применяют в отношении птиц, которых уже сделали более чувствительными в результате первичного подвергания либо живой вакцины, либо полевого вируса. Это можно проверить с помощью серологических методов. Высокие уровни материнских антител можно получить в материнском стаде, вводя, например, живую вакцину в возрасте приблизительно 8 недель, а затем инактивированную вакцину в возрасте 18 недель.

**5 Диагностические методы**

Выделение и идентификация возбудителя обеспечивает наиболее точную диагностику инфекционной бурсальной болезни, но эти методы обычно не используются в рутинных диагностических целях, поскольку вирус иногда сложно выделить. Лабораторная диагностика ИББ зависит от обнаружения специфических антител к вирусу или от обнаружения вируса в тканях с помощью иммунологических или молекулярных методов. В зависимости от целей доступно несколько методов (таблица 1).

**Таблица 1 – Методы исследования для диагностики инфекционной бурсальной болезни и их цель**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Метод** | **Цель** | | | | | |
|  | Свобода популяц ии от инфекци и | Свобода отдельного животного от инфекции перед его перемещени ем | Вклад в политику по искоренен ию | Подтвержде ние клинических случаев | Превалентно сть инфекции - надзор | Иммунны й статус отдельны х животны х или популяции после  вакцинации |
| **Патология и обнаружение вируса** | | | | | | |
| **Гистопаталогическое исследование бурсы** | +a | - | - | +++ | +a | +b |
| **Выделение вируса** | +a | -с | - | +d | +d | - |
| **Характеристика вируса (патотипирование, антигенность,нуклеотидное секвенирование)** | +e | - | - | +++ | +e | +b |
| **Обнаружение вируса в бурсе с помощью иммунологических исследований (AGID, AC-ELISA,**  **иммунологическое окрашивание)** | +a | -с | - | +++ | + | - |
| **Обнаружение вируса с помощью ОТ-ПЦР** | +a | -с | +a | +++ | -f | + |
| **Обнаружение иммунного ответа** | | | | | | |
| **AGID для обнаружения антител** | *++*a | *++* | *++* | *-* | *-* | *+* |
| **ИФА для обнаружения антител** | *+++*a | *+++* | *+++* | *-* | *-* | *+++* |
| **Нейтрализация вируса** | *+*ɡ | *++*ɡ | *-* | *-* | *-* | *++*ɡ |
| a При проведении в крупных масштабах и всегда с отрицательными результатами в зоне без вакцинации и для проверки на субклиническую форму инфекционной бурсальной болезни;  b Можно провести после вакцинации для проверки репликации живой вакцины в бурсе Фабрициуса;  c не подходит, поскольку может дать отрицательные результаты, если инфекция возникла за несколько недель до проведения исследования;  d Трудоемкий метод, который должен быть дополнен характеристикой вируса, чтобы провести дифференциацию между живыми вакцинами и полевыми изолятами;  e Могут понадобиться, если в исследуемых зонах используют живые вакцины;  f Не подходит, так как обычно не проводит дифференциацию между живыми вакцинами и полевыми изолятами;  ɡ Трудоемкий метод, является референтным для неодомашненой птицы, или для видов, отличных от птиц, или когда расследование проводится в отношении малого количества особей, или когда необходимо соотнести наличие обнаруженных антител с защитой. | | | | | | |

**6 Идентификация возбудителя**

6.1 У клинической ИББ четко выраженные характерные признаки и патологоанатомические поражения. В стаде наблюдается высокая заболеваемость, при этом угнетенное состояние у большинства птиц длится в течение 5 – 7 дней. Смертность резко увеличивается за два дня, а затем стремительно снижается в течение следующих 2 – 3 дней. Обычно погибает от 5 до 10 % птиц, но смертность может достигать 30 – 40 % и более при высоковирулентном вирусе инфекционной бурсальной болезни (vvИББV). Основными клиническими признаками являются водянистая диарея, взъерошенное оперение, нежелание двигаться, потеря аппетита, тремор и истощение. Патологоанатомические поражения включают дегидратацию мышц и многочисленные экхимотические кровоизлияния, увеличение и обесцвечивание почек и наличие уратов в канальцах. Бурса Фабрициуса демонстрирует главные диагностические поражения. У птиц, которые погибают на пике вспышки болезни, бурса увеличенная, распухшая, обесцвеченная до бледно желтого. Может наблюдаться интрафолликулярное кровоизлияние и, в некоторых случаях, бурса может быть полностью геморрагической и похожей по внешнему виду на черную вишню. Во многих случаях наблюдается присутствие околосумочной эдемы бледно-желтого цвета в бурсе. Подтверждение клинической болезни или обнаружение скрытой болезни лучше всего проводить с помощью иммунологических методов, поскольку вирус ИББ сложно выделить. Дифференциация между серотипами 1 и 2 или между подтипами или патотипами серотипа 1 должна проводиться в специализированной лаборатории.

**6.2 Подготовка образцов**

Бурсу Фабрициуса удаляют асептическим методом примерно из пяти пораженных цыплят на ранней стадии болезни. Бурсы измельчают с помощью двух скальпелей, добавляют небольшое количество пептонного бульона, содержащего пенициллин и стрептомицин (по 1000 μг/мл каждого), и гомогенизируют в блендере для измельчения ткани. Гомогенат центрифугируют при 3000 gв течение 10 минут. Надосадочную жидкость собирают для использования в исследованиях. Для дальнейшего контроля бактериальной контаминации может понадобиться фильтрация через 0,22 μ фильтр, хотя это может привести к снижению титра вируса.

* 1. **Идентификация с помощью реакции иммунодиффузии в агаровом геле**

Для обнаружения антигена в бурсе Фабрициуса с помощью реакции иммунодиффузии в агаровом геле необходимо асептическим методом удалить бурсу примерно у десяти цыплят во время острой стадии инфекции. Полученную бурсу измельчают с помощью двух скальпелей движениями, напоминающими работу ножниц, затем мелкие кусочки помещают в лунки планшета для реакции иммунодиффузии в агаровом геле против известной положительной сыворотки. Проведение нескольких циклов замораживания и оттаивания измельченной ткани может облегчить извлечение антигенов вируса ИББ из инфицированной ткани бурсы, а экссудат, полученный в результате замораживания и оттаивания, можно использовать для заполнения лунок.

**6.4 Идентификация с помощью иммунофлюоресценции**

Срезы бурсы готовят с помощью криостата*-*микротома, лиофилизируют при комнатной температуре и затем фиксируют в холодном ацетоне. В отношении срезов применяют специфические для вируса ИББ антисыворотки, маркированные флюоресцентным красителем, затем их инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 часа во влажной среде. По окончании инкубационного периода их промывают в течение 30 минут фосфатно-буферным раствором (ФБР), рН 7.2, и затем ополаскивают дистиллированной водой. Срезы монтируют с помощью забуференного глицерина, рН 7.6, и исследуют с помощью УФ микроскопа на флюоресценцию, специфичную для вируса ИББ.

**6.5** **Идентификация с помощью твердофазного иммуносорбентного анализа с захватом антигена (AC-ELISA)**

Планшеты для ELISA сенсибилизируют специфическими для вируса ИББ антителами. В зависимости от выбранного протокола для AC-ELISA, иммобилизованным антителом может служить либо мышиное моноклональное антитело против вируса ИББ (MAb), либо сочетание таких моноклональных антител, либо куриная постинфекционная поликлональная сыворотка против вируса ИББ. Образцы гомогенатов бурсы (см. 6.2), разбавленные от 1/10 до 1/25 (в/о) в подходящем буфере для разведения инкубируют в сенсибилизированных лунках. Несвязанные антигены удаляют в конце инкубационного периода путем промывания подходящим отмывочным буфером (например, ФБР, рН 7.2 + 0,2 % Tween 20). Затем выявляют захваченные антигены, как в непрямой ИФА, с идентифицирующим антителом, за которым следует конъюгат фермента, который связывается только идентифицирующим антителом, за которым следует ферментный субстрат. Оптические плотности, которые сравнивают количество захваченных антигенов вируса ИББ, считывают с помощью ИФА-ридера.

AC-ELISA основан на использовании образцов, которые могут содержать живой вирус, и должен проводится только в условиях соответствующей биозащиты, таких как ламинарный бокс II класса защиты. Все жидкие вещества (отмывочные буферы) и твердые отходы считаются контаминированными вирусом ИББ и должны быть соответствующим образом обезврежены перед утилизацией.

Важными этапами при применении и оценке AC-ELISA являются:

а) необходимость в проведении экстенсивной отмывки между всеми стадиями реакции, чтобы фоновые реакции были на низком уровне;

б) необходимость включения известных положительных и отрицательных образцов в каждое исследования в качестве контрольных;

в) необходимость положительной реакции как иммобилизованных, так и идентифицирующих антитела со всеми штаммами вируса ИББ серотипа 1 (иммобилизованные и идентифицирующие антитела не должны сильно зависеть от антигенной вариации вируса ИББ, которая встречается среди штаммов серотипа 1).

**6.6 Идентификация с помощью молекулярных методов**

6.6.1 Методы молекулярной вирусологии позволяют идентифицировать вирус ИББ быстрее, чем выделение вируса. Наиболее часто используемый молекулярный метод – обнаружение генома вируса ИББ с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). С помощью данного метода выявляют геном вирусов, которые не реплицируют в культуре клеток, поскольку выращивание вируса перед амплификацией не обязательно.

ОТ-ПЦР проводят в три этапа: извлечение нуклеиновых кислот из исследуемых образцов, обратная транскрипция (ОТ) РНК вируса ИББ в кДНК, и амплификация полученной кДНК с помощью ПЦР. Два последних этапа предполагают, что пользователь выбирает олигонуклеотидные праймеры, которые представляют собой короткие последовательности, дополняющие вирус-специфическую нуклеотидную последовательность. В зависимости от места, откуда были выбраны праймеры амплифицируют разные участки генома.

6.6.2 Экстрагирование нуклеиновых кислот

В отличие от одноцепочечной РНК, геном двухцепочечной РНК (дсРНК) вируса ИББ устойчив к деградации РНКазами. Инфицированные клетки содержат разновидности одноцепочечных РНК положительного смысла, полученных из вируса ИББ, которые можно использовать в качестве модели на этапе обратной транскрипции, и которые могут усилить чувствительность исследования. Экстрагирование РНК проводят с использованием перчаток и свободных от РНКазы реагентов и лабораторной посуды.

РНК вируса ИББ можно экстрагировать из инфицированных тканей с помощью готовых наборов. Можно экстрагировать РНК вируса ИББ, добавив 1 % (вес/объем конечной концентрации) натрий додецилсульфат и 1 мг/мл протеиназы К в 700 μл суспензии вируса (например, гомогената бурсы) и инкубировав при температуре 37 °С в течение 60 минут. Нуклеиновые кислоты получают, следуя стандартному протоколу для экстрагирования фенола/хлороформа.

Примечание – Фенол токсичен и требует соответствующего обращения и утилизации).

Нуклеиновые кислоты собирают из конечной водной фазы посредством преципитации этанолом и повторно суспендируют в свободной от РНКазы дистиллированной воде или подходящем буфере. До использования разбавленную водой РНК хранят в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С.

6.6.3 Обратная транскрипция

Использование «Нижний» праймера ПЦР (дополнительный к геному вируса ИББ, содержащему положительную РНК) для обратной транскрипции позволяет провести синтез кДНК как из положительной цепи генома двухцепочечной положительной РНК вируса ИББ, так и из полученных из вируса ИББ одноцепочечных РНК положительного смысла, содержащихся ранее в инфицированных клетках. Можно использовать случайные праймеры (гексануклеотиды), чтобы направить синтез кДНК.

Перед помещением в реакционную смесь для обратной транскрипции матрикс РНК вируса ИББ необходимо денатурировать. Одну часть (по объему) диметилсульфоксида категории молекулярной биологии добавляют к четырем частям размороженного раствора РНК вируса ИББ. Нагревают при температуре 92 °С в течение 3 минут и охлаждают на льду, допускается нагревать в течение 5 минут, а затем незамедлительно инкубировать смесь в жидком азоте. Необходимый объем денатурированного матрикса помещают в реакционную смесь. Инкубируют в соответствие с инструкциями поставщика фермента.

Раствор кДНК, полученный после этапа обратной транскрипции, хранят в замороженном виде при температуре ниже минус 20 °С. Если этап ПЦР отложить на несколько недель после синтеза кДНК, это может привести к ложным отрицательным результатам ПЦР.

6.6.4 Полимеразная цепная реакция

Имеется большое разнообразие полимераз ДНК, подходящих для ПЦР. Для приготовления реакционной смеси для ПЦР необходимо следовать инструкциям производителя. В большинстве исследований ПЦР, штаммы вируса ИББ могут существовать с изменениями нуклеотидов в позиции отжига праймеров, требуя использование праймеров для оптимизации обнаружения с помощью ОТ-ПЦР.

Комбинация протоколов ОТ-ПЦР, нацеленной на сегмент А и сегмент В, увеличивает вероятность обнаружения серотипа 1 вируса ИББ если он присутствует и позволяет cделать подробную генетическую характеристику обнаруженных штаммов вируса ИББ.

Нуклеотидная последовательность U3 и L3 специфических для вируса ИББ праймеров ПЦР (специфическая для сегмента А гена VP2):

Верхний U3: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GCA-TGC-GGT-*ATG- TGA-GGC-TTG-GTG-AC*-3'

Нижний L3: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC**-GAA-TTC-*GAT-CCT-GTT- GCC-ACT-CTT-TC*-3'

Нуклеотидная последовательность специфических для вируса ИББ праймеров ПЦР +226 и -739 (специфическая для сегмента В, гена VP1):

Верхний +290: 5'-**TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT**-GAA-TTC-*AGA-TTC- TGC-AGC-CAC-GGT-CTC-T*-3'

Нижний -861: 5'-**CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-**CTG-CAG-*TTG-ATG- ACT-TGA-GGT-TGA-TTT-TG*-3'

Длина обоих праймеров U3 и L3 составляет 44 нуклеотида, в то время как длина праймеров +290 и –861 – 46 и 47 нуклеотидов. Четыре праймера содержат специфический для вируса ИББ 3'-конец (в последовательности, указанной выше, он выделен курсивом), который соответствует позициям 657-676 и 1193-1212 сегмента А вируса ИББ в праймерах U3 и L3, соответственно (нумерация, как в сегменте А штамма Р2, код доступа X84034), и позициям нуклеотида 290-311 и 861-883 сегмента В вируса ИББ в праймерах +290 и -861 (нумерация, как в сегменте В штамма D6948, код доступа AF240687). Специфический для вируса ИББ конец соединен 5'-концом не вируса ИББ (выделено жирным шрифтом в последовательности выше), соответствуя М13 и RM13 универсальным праймерам в верхних и нижних праймерах. Универсальные праймеры М13 и RM13 обычно используются в качестве праймеров для секвенирования ДНК, так что очищенные продукты ПЦР, полученные в результате амплификации с помощью пар праймеров U3/L3 и +290/-861, можно легко секвенировать в обоих направлениях. Сайты рестрикции (подчеркнуты в последовательностях) включают в следующие рестрикционные эндонуклеазы: *Sph*I (в праймере U3), *Eco*Rl (в праймерах L3 и +290), *Pst* I (в праймере -861). Данные сайты рестрикции располагают так, чтобы при необходимости можно было клонировать продукты ПЦР, полученные в результате амплификации пар U3/L3 и +290/-861. Пара U3/L3 генерирует продукт длиной в 604 пары оснований (п.о.), при этом 516 пар оснований являются специфическими для последовательности вируса ИББ и охватывают область, кодирующую чрезвычайно изменчивую область белка VP2. Пара +290/-861 генерирует продукт длиной 642 пары оснований, из которых 549 пар оснований являются специфическими для амплифицированной последовательности вируса ИББ. Оба продукта получают из областей генома, которые подходят для филогенетического анализа.

Следуя рекомендациям поставщика полимеразы ДНК, проводят начальный этап денатурации, затем проводят 35 циклов, каждый из которых включает этап денатурации, отжига и элонгации. В таких циклах, где денатурация проводится при температуре 95 °С в течение 30 секунд и отжиг при температуре 64 °С в течение 45 секунд, можно использовать обе пары праймеров U3/L3 и +290/-861 (температуру отжига следует изменить, если используются другие праймеры). Параметры проведения элонгации устанавливаются в соответствии с рекомендациями поставщика.

Обнаружение можно проводить с помощью электрофореза с продуктами ПЦР и маркерами молекулярного веса ДНК в 1 % агарозном геле, окрашенном бромидом этидия.

Примечание – Бромид этидия является токсичным и канцерогенным. Его необходимо использовать и утилизировать соответствующим образом.

Для каждого образца кДНК необходимо провести три реакции ПЦР (чистой, 10- и 100-кратно разведенной кДНК), чтобы избежать ложно-отрицательных результатов, которые могут возникнуть по причине ингибирования ПЦР в смесях, содержащих большое количество препарата кДНК.

Каждая ПЦР должна включать отрицательную и положительную контрольные реакции. Разработаны протоколы, которые включают внутренний контроль для тестирования на присутствие ингибиторов ПЦР.

Отсрочка ПЦР на несколько недель после проведения этапа обратной транскрипции может привести к ложным отрицательным результатам ПЦР.

Для диагностики инфекционной бурсальной болезни можно провести одноступенчатую ОТ-ПЦР с использованием, как традиционных методов, так и методов в реальном времени.

**6.7 Выделение вируса в культуре клетки**

0,5 мл образца инокулируют в каждую из четырех свежеконфлюэнтных культур фибробластов куриных эмбрионов (CEF) (из источника, свободного от специфических патогенов (СПФ)) во флаконах объемом 25 см2. Проводят адсорбцию при температуре 37 °С в течение 30 – 60 минут, дважды промывают сбалансированным солевым раствором Игла и добавляют в каждый флакон поддерживающую среду. Культуры инкубируют при температуре 37 °С, ежедневно осматривая на наличие цитопатического эффекта (CPE). Он характеризуется появлением маленьких круглых рефракционных клеток. Если в течение 6 дней цитопатотический эффект не наблюдается среду сливают, затем культуры замораживают-оттаивают и вводят полученный лизат в свежие культуры. Иногда данную процедуру необходимо провести как минимум три раза. При возникновении цитопатотического эффекта вирус необходимо исследовать против моноспицефической антисыворотки к вирусу ИББ с помощью теста вирус нейтрализации в культуре ткани (VN). Более патогенные штаммы вируса ИББ обычно не невозможно вырастить в фибробластах куриных эмбрионов, если только изначально вирус не подвергли экстенсивному серийному пассажу в эмбрионах.

**6.8 Выделение вируса в эмбрионах**

0,2 мл образца вводят в желточный мешок пяти 6-8-дневным отрицательным к специфическим антителам (SAN) куриным эмбрионам и на хориоаллантоисную мембрану пяти 9-11-дневных SAN куриных эмбрионов. SAN эмбрионы получают из серологически отрицательных к вирусу ИББ стад. Ежедневно проводят овоскопирование и удаляют эмбрионы, которые погибли в течение 48 часов после инокуляции. Эмбрионы, которые погибли по истечении этого времени, исследуют на поражения. Вирус ИББ серотипа 1 приводит к карликовости эмбрионов, подкожному отеку, гиперемии и подкожному или внутричерепному кровоизлиянию. Печень обычно распухшая, местами с признаками гиперемии, создающая эффект мраморности. В случае более поздней гибели, печень может быть распухшей и зеленоватого цвета, с участками некроза. Селезенка увеличена, а почки распухшие с признаками гиперемии, которые создают эффект мраморности. В случае если наблюдаются поражения – необходимо исследовать вирус против моноспецифической сыворотки против вируса ИББ с помощью реакции нейтрализации вируса, извлеченного из эмбриона.

При первичном извлечении вирус ИББ серотипа 1 приводит к гибели как минимум нескольких эмбрионов.

Вирус ИББ серотипа 2 не индуцирует подкожный отек или кровоизлияние у инфицированных эмбрионов, эмбрионы более маленького размера с изменением цвета на бледно-желтый.

Для приготовления посевного вируса, размножаемого в эмбрионе, или для последующего проведения пассажей асептическим методом собирают эмбрионы с поражениями или эмбрионы, которые считают инфицированными. Голову и конечности удаляют, а тело мелко режут.

**6.9 Дифференциация штаммов**

Штаммы вируса ИББ далее можно идентифицировать, исследуя их патогенность на SAN цыплятах (путем изучения их антигенной реактивности в перекрестных реакциях вирус нейтрализации), или с помощью моноклональных антител (путем установления нуклеотидной последовательности продуктов амплификации ОТ-ПЦР, полученных из генома вируса ИББ), или изучив число и размер фрагментов рестрикции, полученных путем обработки таких продуктов ОТ-ПЦР рестрикционными эндонуклеазами. Исследования проводят в специальных лабораториях, исследования должны включать набор референтных штаммов для контроля.

6.10.1 Изучение патогенности

Исследования на сравнение штаммов вируса ИББ должны проводиться в биологически безопасных помещениях для избежания распространения изучаемого вируса. Во избежание попадания загрязняющего вещества необходимо использовать SAN птиц с известным микробиологическим статусом (СПФ цыплят).

При сравнении результатов испытаний на патогенность основными переменными величинами являются порода, возраст, иммунный статус зараженных цыплят, доза и способ введения вируса для контрольного заражения и возможное наличие контаминирующих агентов в инокулуме. Легкие породы яичного направления более восприимчивы, чем тяжелые породы мясного направления. Разница в восприимчивости может проявиться в различных линиях СПФ цыплят. Наиболее восприимчивыми к острой форме ИББ являются цыплята в возрасте от 3 до 6 недель. Необходима большая доза вируса для контрольного заражения, чтобы сразу же инфицировать всех инокулированных цыплят, избегая передачи инокулированного вируса от птицы к птице. Наличие в инокулуме контаминирующих агентов, таких как аденовирус или вирус инфекционной анемии кур, может модифицировать степень тяжести ИББ и признаков, наблюдаемых после контрольного заражения.

Термины «вариант», «классический» и «очень вирулентный» используются, чтобы описать штаммы вируса ИББ с разной патогенностью. На основании признаков и поражений, наблюдаемых у двух линий СПФ цыплят породы белый леггорн во время экспериментальной инфекционной бурсальной болезни в тяжелой форме, после контрольного заражения 105 50 % инфицирующей эмбрионы дозой (EID50), северо-американский «вариант» вирусов ИББ индуцирует небольшое количество признаков, которые могут вообще отсутствовать, как и смертность, отмечаются поражения бурсы. «Классические» вирусы ИББ индуцируют приблизительно 10 – 50 % смертность с типичными признаками и поражениями, а «очень вирулентные» вирусы ИББ индуцируют примерно 50 – 100 % смертность с типичными признаками и поражениями.

6.10.2 Исследование внтигенности

Антигенное родство среди штаммов вируса ИББ можно в ходе перекрестных реакций вирус нейтрализации, которые лучше всего коррелирует с перекрестной защитой. Когда изучаемые вирусы не растут в фибробластах куриных эмбрионов (например, очень вирулентный вирус ИББ (vvИББV)), такие исследования необходимо проводить на SAN яйцах с эмбрионами. Различия в результатах перекрестной реакции вирус нейтрализации между штаммами вируса ИББ серотипа 1 привели к определению «подтипов» серотипа 1, некоторые из которых включают антигенный «вариант» северо- американских изолятов вируса ИББ.

Другой способ изучить генетическое родство – использовать мышиные моноклональные антитела, которые присоединяются к нейтрализующим эпитопам вируса ИББ. Во всем мире существует несколько панелей моноклональных антител для использования в ИФА с захватом антигена. Некоторые моноклональные антитела включены в коммерческие наборы, но до сих пор не было предложено универсального набора моноклональных антител. Все нейтрализующие эпитопы вируса ИББ отображены в главном иммуногеном домене в средней трети (позиции аминокислот с 200 по 340) внешнего капсидного белка VP2. Данная область носит название «VP2 вариабельный домен», поскольку в ней заключено большинство изменений аминокислот, наблюдаемых среди штаммов вируса ИББ. В пределах vVP2 особую важность для антигенности имеют четыре аминокислотных фрагмента, которые называют гидрофильными пиками vVP2. Это позиции аминокислот с 210 по 225 (главный пик А), с 249 по 252 (второстепенный пик 1), с 281 по 292 (второстепенный пик 2) и с 313 по 324 (главный пик В). Согласно кристаллической структуре белка VP2 и частиц вируса инфекционной бурсальной болезни участки аминокислоты, ранее известные как «гидрофильные пики VP2», соответствуют наиболее выдающимся аминокислотным петлям в проекции домена белка VP2.

6.10.3 Молекулярная идентификация

Нуклеотидное секвенирование продуктов ОТ-ПЦР представляет собой подход, позволяющий более точно определить генетическое родство между штаммами вируса инфекционной бурсальной болезни. Адаптация культуры клеток штаммов вируса инфекционной бурсальной болезни принципиально зависит от пар аминокислот 279 N-284 T или 253 H-284 T VP2. В большинстве очень вирулентных вирусов присутствуют четыре типичные аминокислоты (222 А, 256 I, 294 I и 299 S).

Сегмент А и В вируса ИББ коэволюционируют (т.е. большинство значимых кластеров вируса ИББ, такие как родственные с вирусом vvИББ штаммы, можно идентифицировать путем анализа обоих сегментов генома). Идентифицированы некоторые потенциально реассортантные вирусы. Патогенность предполагаемого реассортантного вируса инфекционной бурсальной болезни часто модифицирована, если сравнить с тем, что можно было бы ожидать от характеристики только одного сегмента А. [Рекомендуется](https://www.google.it/search?q=%D0%A2%D0%B0%D0%BA%D0%B8%D0%BC%2B%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%BC%2C%2B%D0%A0%D0%B5%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D1%83%D0%B5%D1%82%D1%81%D1%8F%2B%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%82%D1%8C%2B%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D1%83%D1%8E%2B%D0%98%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8E%2B%D0%98%D0%B7%D0%BE%D0%BB%D1%8F%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%B0%2B%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D1%83%D1%80%D1%81%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BD%D0%B8%2B%D0%BD%D0%B0%2B%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B8%2B%D1%81%D0%B5%D0%BA%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F%2B%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D0%B8%D1%85%2B%D1%81%D0%B5%D0%B3%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%B0.&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwi3iOna6pPXAhVKL1AKHX1YANIQvwUIIygA) [проводить молекулярную идентификацию изолятов вируса](https://www.google.it/search?q=%D0%A2%D0%B0%D0%BA%D0%B8%D0%BC%2B%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%BC%2C%2B%D0%A0%D0%B5%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D1%83%D0%B5%D1%82%D1%81%D1%8F%2B%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%82%D1%8C%2B%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D1%83%D1%8E%2B%D0%98%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8E%2B%D0%98%D0%B7%D0%BE%D0%BB%D1%8F%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%B0%2B%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D1%83%D1%80%D1%81%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BD%D0%B8%2B%D0%BD%D0%B0%2B%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B8%2B%D1%81%D0%B5%D0%BA%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F%2B%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D0%B8%D1%85%2B%D1%81%D0%B5%D0%B3%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%B0.&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwi3iOna6pPXAhVKL1AKHX1YANIQvwUIIygA) [инфекционной бурсальной болезни на основании секвенирования](https://www.google.it/search?q=%D0%A2%D0%B0%D0%BA%D0%B8%D0%BC%2B%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%BC%2C%2B%D0%A0%D0%B5%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D1%83%D0%B5%D1%82%D1%81%D1%8F%2B%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%82%D1%8C%2B%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D1%83%D1%8E%2B%D0%98%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8E%2B%D0%98%D0%B7%D0%BE%D0%BB%D1%8F%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%B0%2B%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D1%83%D1%80%D1%81%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BD%D0%B8%2B%D0%BD%D0%B0%2B%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B8%2B%D1%81%D0%B5%D0%BA%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F%2B%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D0%B8%D1%85%2B%D1%81%D0%B5%D0%B3%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%B0.&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwi3iOna6pPXAhVKL1AKHX1YANIQvwUIIygA) [обоих сегментов генома.](https://www.google.it/search?q=%D0%A2%D0%B0%D0%BA%D0%B8%D0%BC%2B%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%BC%2C%2B%D0%A0%D0%B5%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D1%83%D0%B5%D1%82%D1%81%D1%8F%2B%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%82%D1%8C%2B%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D1%83%D1%8E%2B%D0%98%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8E%2B%D0%98%D0%B7%D0%BE%D0%BB%D1%8F%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%B0%2B%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D1%83%D1%80%D1%81%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%B9%2B%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BD%D0%B8%2B%D0%BD%D0%B0%2B%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B8%2B%D1%81%D0%B5%D0%BA%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F%2B%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D0%B8%D1%85%2B%D1%81%D0%B5%D0%B3%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2%2B%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC%D0%B0.&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwi3iOna6pPXAhVKL1AKHX1YANIQvwUIIygA)

**7 Серологические тесты**

7.1 Образцы крови необходимо отбирать на ранней стадии болезни, а повторные образцы отбирают спустя три недели. Поскольку вирус распространяется быстро необходимо отобрать образцы от небольшого количества особей из стада. Как правило, достаточно 20 образцов крови обнаружено ни одного антигенного маркера, который бы коррелировал непосредственно с патогенностью вируса ИББ.

**7.2 Реакция иммунодиффузии в агаровом геле**

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) является наиболее простым из серологических тестов для обнаружения специфических антител в сыворотке.

7.2.1 Подготовка положительного контрольного антигена

3-5-недельных цыплят инокулируют очищенным 10 % (в/о) гомогенатом бурсы, содержащим жизнеспособный вирус ИББ3, путем закапывания в глаза. Через 3 дня после инокуляции производят гуманный убой птицы и отбирают бурсу асептическим методом. Геморрагическую бурсу удаляют, а оставшуюся часть объединяют в пул, взвешивают и добавляют равную по объему холодную дистиллированную воду (либо подходящий буфер, такого как ФБР или триптозо-фосфатный бульон) и равный по объему неразбавленный хлористый метилен.

Примечание – Хлористый метилен является токсичным и, возможно, канцерогенным. Он требует соответствующего обращения и утилизации. Во избежание причинения вреда здоровью в качестве альтернативы можно использовать трихлортрифторэтан, который представляет угрозу для окружающей среды и, таким образом, требует соответствующего обращения и утилизации.

Смесь тщательно гомогенизируют в блендере для тканей и центрифугируют при 2000 gв течение 30 минут. Надосадочную жидкость собирают, делят на аликвоты и далее хранят при температуре минус 40 °С. Антиген содержит живой вирус, поэтому работать с ним можно только в помещениях соответствующего класса защиты, таких как бокс II класса защиты. До розлива антиген можно инактивировать. Для этого нужно добавить 0,3 % (о/о) β-пропиолактон в собранную надосадочную жидкость, затем инкубировать при температуре 37 °С в течение 2 часов. Важно, чтобы инкубирование проходило на орбитальном встряхивателе или на механическом встряхивателе-качалке, чтобы внутренняя сторона флакона, которая имела контакт с живым вирусом, контактировала с β- пропиолактоном. Делят на аликвоты и хранят при температуре минус 40 °С. Эффективность инактивации проверяют, выделяя вирус ИББ из инактивированного антигена в ходе трех серийных пассажей в SAN куриных эмбрионах.

7.2.2 Подготовка положительной контрольной антисыворотки

4 – 5-недельных восприимчивых цыплят инокулируют 0,05 мл очищенного 10 % (в/о) гомогената бурсы, который содержит живой вирус ИББ, путем закапывания в глаза. Птицу обескровливают через 28 дней после инокуляции. Сыворотку объединяют в пулы и хранят в аликвотах при температуре минус 20 °С.

7.2.3 Подготовка агара

Хлорид натрия (80 г) и фенол (5 г) растворяют в дистиллированной воде (1 литре).

Примечание – Фенол токсичен и требует соответствующего обращения и утилизации.

Добавляют агар (12,5 г) и обрабатывают паром до его полного растворения. Чтобы избежать причинения вреда здоровью и окружающей среде использованием фенола, можно использовать следующий рецепт приготовления агара: смешивают хлорид натрия (80 г), дигидрогенфосфат калия (0,45 г), натрия гидрогенфосфат дигидрат (1,19 г), агар (10 г) и дистиллированную воду до конечного объема 1 литр (конечный рН 7,1 при температуре 20 °С – 25 °С). Смесь, полученную по второму рецепту, можно гомогенизировать путем нагревания до 90 °С и перемешивания. Смесь фильтруют в горячем виде через подушечку из целлюлозной ваты, покрытой несколькими слоями муслина и распределить в стеклянные флаконы по 20 мл. Среду без фенола стерилизуют автоклавированием при температуре (максимум) 115 °С в течение 15 минут. До использования флаконы хранят при температуре 4 °С.

7.2.4 Процедура тестирования

а) Планшеты подготавливают за 24 часа – 7 суток до использования. Растворяют агар, поместив его в паровой аппарат, или на водяной бане, избегая попадания воды во флаконы.

б) Содержимое одного флакона разливают в каждую из требуемого количества 9 см пластиковых чашек Петри, расставленных на ровной поверхности.

в) Планшеты накрывают крышкой и дают агару осесть, планшеты хранят при температуре 4 °С. Планшеты с содержимым можно хранить до 7 дней при температуре 4 °С.

Примечание – В случае если планшеты планируется использовать в тот же день, когда был розлит агар, необходимо высушить их в открытом и перевернутом виде при температуре 37 °С в течение 30 мин – 1 часа.

Изображение выглядит как текст, снимок экрана, программное обеспечение, Значок на компьютере

Автоматически созданное описание

Рисунок 1 – Протокол исследования на антитело Рисунок 2 – Протокол исследования на антиген

Т=тестовые сыворотки Т=тестовые сыворотки

Примечания

1 Предпочтительно использование линейной модели лунок, хотя можно использовать и модель шестигранник. Каждую исследуемую сыворотку или бурсу (Т на рисунках 1 и 2 выше) необходимо поместить рядом с положительным контролем антитела (АВ) или антигена (AG).

2 Используют планшет с лунками глубиной 3 мм, диаметром 6 мм, расположенные в 3 мм друг от друга (или с лунками другого размера, которые ранее показали свою эффективность).

а) Вырезают три вертикальных ряда лунок, диаметром 6 мм, на расстоянии 3 мм друг от друга, используя шаблон и цилиндрический резак.

б) Удаляют агар из лунок путем отсасывания или используя ручку и наконечник, стараясь не повредить стенки лунок.

в) С помощью пипетки распределяют 50 μл тестируемых сывороток по лункам, как показано на рисунке 1.

Либо для обнаружения антигенов вируса ИББ в бурсе:

С помощью щипцов с закругленными концами распределяют мелкие кусочки хорошо порезанной тестируемой бурсы по лункам, как показано на рисунке 2, чтобы заполнить лунки. В качестве альтернативы лунки можно заполнить жидкостью, полученной в ходе замораживания-оттаивания порезанных тканей.

а) 50 μл положительных и отрицательных контрольных реагентов распределяют по соответствующим лункам.

б) Планшеты инкубируют при температуре от 22 °С до 37 °С в течение 48 часов во влажной камере, чтобы избежать высыхание агара.

в) Планшеты просматривают против темного фона под косым освещением через 24 и 48 часов.

7.2.5 Количественные методы иммунодиффузии в агаровом геле

Реакцию иммунодиффузии в агаровом геле можно проводить для измерения уровней антител, используя разведения сыворотки в тестовых лунках и принимая за титр наивысшее разведение, необходимое для получения линии преципитации. Это важно для измерения материнских и вакцинных антител и для установления наиболее подходящего для вакцинации времени, но данный количественный метод AGID широко заменяется ИФА.

**7.2 Реакция вирус нейтрализации**

Реакции вирус нейтрализации проводят в культуре клеток. Настоящий метод более трудоемкий по сравнению с AGID, но более чувствительный для обнаружения антител. Такая чувствительность не требуется при рутинной диагностике, но может быть полезной при оценке реакции на вакцину или при дифференциации между серотипами 1 и 2 вируса ИББ. В исследовании используются либо клетки фибробластов СПФ куриных эмбрионов, либо подходящая линия перевиваемых клеток (как QT-35, BGM-70, MA-104 или DF1) в сочетании с адаптированным штаммом вируса инфекционной бурсальной болезни.

0,05 мл вируса, разведенного в среде культуры тканей, содержащей 100 TCID50 (50 % инфекционных доз культуры тканей) на 0,05 мл, помещают в каждую лунку микротитровального планшета для культуры тканей. Тестовые сыворотки инактивируют путем нагревания при температуре 56 °С в течение 30 минут. Готовят двойные серийные разведения сывороток в разведенном вирусе. Через 30 минут при комнатной температуре 0,2 мл клеточной суспензии с плотностью клеток, которая позволяет получить конфлюэнтный слой после 24 часов инкубации, распределяют по лункам. Планшеты запечатывают и инкубируют при температуре 37 °С в течение 4 – 5 дней, далее проверяют под микроскопом монослой на наличие ЦПЭ. Конечная точка (титр сыворотки) выражается как величина, обратная наивысшему разведению сыворотки, при котором не наблюдалось ЦПЭ. Чтобы сократить различия от теста к тесту и от оператора к оператору в каждую серию тестов можно включить стандартизированную антисыворотку, при этом титр вирусной суспензии нужно заново оценивать после каждого испытания, необходимо провести достаточное количество повторов (лунок) на одно разведение вируса.

**7.3 Твердофазный иммуносорбентный анализ**

Для обнаружения антител к вирусу ИББ используют ИФА. Планшеты сенсибилизируют очищенным или частично очищенным приготовлением вируса, что требует особых навыков и техники.

Сыворотки разводят согласно установленному протоколу или инструкции набора, каждую сыворотку разливают в необходимое количество лунок. После инкубирования в соответствующих условиях необходимо удалить сыворотки из планшетов и тщательно промыть лунки. Антикуриные иммуноглобулины, конъюгированные с ферментом, разливают по лункам и соответствующим образом инкубируют планшеты. Перед добавлением в планшет субстрата, содержащего хромоген, который приводит к изменению цвета в случае наличия фермента, необходимо очистить планшеты от содержимого и промыть их. После последней стадии инкубирования реакцию субстрата/хромогена останавливают путем добавления подходящего стоп-раствора и определяют количество цветных реакций, измерив оптическую плотность в каждой лунке. Расчитывают отношение Образец/Положительный результат для каждого образца.

**7.4 Обработка результатов**

Реакция иммунодиффузии в агаровом геле чувствительная, но не такая чувствительная, как реакция вирус нейтрализации, которая показывает титр, когда результат реакции иммунодиффузии в агаровом геле отрицательный. Положительные реакции указывают на наличие инфекции у невакцинированных птиц без материнских антител. В качестве ориентира, положительная реакция иммунодиффузии в агаровом геле у вакцинированных птиц или молодых птиц с материнскими антителами указывает на наличие защитного уровня антител. ИФА дает результаты быстрее, чем реакция вирус нейтрализации или реакция иммунодиффузии в агаровом геле, и менее трудоемка. Титры реакции вирус нейтрализации и реакции иммунодиффузии в агаровом геле хорошо коррелируют, но как только реакция вирус нейтрализации становится более чувствительной, титры реакции иммунодиффузии в агаровом геле пропорционально снижаются. Корреляция между ИФА и реакцией вирус нейтрализации, и между ИФА и реакцией иммунодиффузии в агаровом геле более вариабельна и зависит от источника реагентов для ИФА. Оба метода (ИФА и реакция вирус нейтрализации) являются высокочувствительными и могут варьировать как внутри одной лабораторий, так и между лабораториями. При анализе на снижение уровня материнских антител, реакция вирус нейтрализации часто показывает остаточные антитела в возрасте, когда ИФА уже дает отрицательные результаты. Неспецифические положительные реакции могут возникнуть при большинстве ИФА, потому что они разработаны для мониторинга реакций на вакцину, в котором чувствительность считается более важным показателем, чем специфичность. Необходимо учитывать это при проведении ИФА в целях диагностики. В отношении коммерческих стад кур или экспериментально зараженных кур следует учитывать то, что ИФА с использованием антигена серотипа 1 определит антитела, индуцированные вирусом ИББ серотипа 2.

**8 Требования к вакцинам**

**8.1 Общая информация**

Имеется четыре основных типа вакцин для контроля инфекционной бурсальной болезни:

а) живые аттенуированные вакцины;

б) иммунокомплексные вакцины;

в) рекомбинантные живые векторные вакцины, экспрессирующие антигены к вирусу инфекционной бурсальной болезни;

г) инактивированные масляно-имульсионные вакцины с адъювантом.

Вакцины против ИББ делают на основе вируса ИББ серотипа 1, хотя серотип 2 обнаруживали у домашней птицы. Вирус серотипа 2 не связывают с болезнью, но его присутствие будет стимулировать выработку антител. Антитела серотипа 2 не обеспечивают защиту против инфекции, вызванной серотипом 1 и не противодействуют ответной реакции на вакцину типа 1. Для обеспечения хорошей защиты против некоторых из антигенных вариантов вируса серотипа 1, в инактивированных вакцинах, приготовленных из «классического» вируса серотипа 1, должно содержаться достаточно большое количество антигенов.

**8.2 Живые вакцины: способы применения**

Живые вакцины против ИББ производят из полностью или частично аттенуированных штаммов вируса, которые известны как «слабый», «средний» или «средний плюс» («сильный»).

Слабые или средние вакцины применяют в отношении к родительскому поголовью, чтобы, используя инактивированную вакцину, продуцировать первичный ответ до вакцинации, которая проходит незадолго до начала периода яйцекладки. Они чувствительны к материнским антителам, поэтому вводить их нужно только после того, как материнские антитела исчезнут. Вакцины используются путем внутримышечного введения, распыления или путем выпаивания на 8 неделе жизни.

Средние и средние плюс вакцины используют для защиты бройлеров и ремонтных коммерческих несушек. Некоторые из этих вакцин используют в отношении к молодым родителям, если существует большой риск естественного заражения вирулентным вирусом ИББ. Несмотря на то, что средние вакцины чувствительны к материнским антителам, их иногда вводят однодневным птицам, путем распыления, чтобы защитить всех цыплят в стаде, у которых может не быть материнских антител или у которых их очень мало. В этом случае в пределах стада устанавливается резервуар вакцинного вируса, который делает возможным латеральную передачу другим цыплятам, когда их материнские антитела исчезают. Вакцинация проводится второй и третий раз, когда существует большой риск подверженности вирулентным формам болезни, или когда у вакцинированных цыплят неравные уровни материнских антител. Время проведения повторных вакцинаций будет зависеть от титров антител родителей в то время, когда они несли яйца. Ориентировочно вторую дозу вводят на 10 – 14 день жизни, когда около 10 % стада чувствительны к ИББ, а третью дозу на 7 – 10 дней позднее. Способ введения – распыление или выпаивание. К внутримышечному введению или закапыванию в глаза прибегают редко. Если вакцину вводят путем выпаивания, необходимо использовать чистую воду с нейтральным показателем pH, без запаха или вкуса хлора и металла. Можно добавить сухое обезжиренное молоко в соотношении 2 г на литр. Необходимо удостовериться в том, что все птицы получили свою дозу вакцины. Для этого за 2 – 3 часа до подачи воды с вакциной необходимо убрать всю воду (отключить), и убедиться в том, что в поилках и водопроводных трубах не осталось воды. Можно разделить воду с вакциной на две части, и дать вторую часть через 30 минут после первой.

Живые вакцины против ИББ считаются совместимыми с другими вакцинами для птиц, но вакцины против ИББ, которые вызывают повреждение бурсы, могут повлиять на реакцию на другие вакцины. Вакцинируют только здоровых птиц. До использования флаконы с вакциной хранят при температуре от 2 °С до 8 °С.

**8.3 Иммунокомплексные вакцины: методы применения**

Для изготовления иммунокомплексных вакцин против инфекционной бурсальной болезни живой инфекционный вирус вакцины против вируса инфекционной бурсальной болезни смешивают со специфическими против вируса ИББ антителами. Такие вакцины можно вводить в инкубаторно- птицеводческих станциях путем инъекции *in ovo* на 18-ый день инкубирования. Яйца продолжают инкубировать, а вакцинный вирус предположительно выходит, когда цыплята достигают 7 – 14-дневного возраста. Иммунокомплексные вакцины можно вводить подкожно в первый день на инкубаторно-птицеводческой станции.

**8.4 Живые рекомбинантные векторные вакцины: методы применения**

Живые рекомбинантные вакцины, которые используют вирусный вектор (герпесвирус индеек) для экспрессии антигена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни у кур, была разработана для использования in-ovo или в отношении однодневных птиц. Подтверждена активность на фоне материнских антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни и совместимость с другими вакцинами против болезни Марека. Образование антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни, в результате действия живых рекомбинантных вакцин против вируса ИББ, экспрессирующих белок VP2, будет включать антитела, направленные только против VP2 (по сравнению с антителами ко всем белкам вируса инфекционной бурсальной болезни, в первую очередь VP2 и VP3, после инфицирования живым вирусом инфекционной бурсальной болезни). Нейтрализующие антитела к белку VP2 можно обнаружить с помощью реакции нейтрализации вируса, а для обнаружения VP2-специфического гуморального ответа с помощью ИФА может потребоваться специальный набор с повышенной чувствительностью. Поскольку антитела к VP3 отсутствуют у птиц, вакцинированных живой рекомбинантной вакциной против вируса ИББ, но присутствуют у птиц, инфицированных живым вирусом инфекционной бурсальной болезни, совместное проведение ИФА для выявления антиVP2 и антиVP3 специфичных антител позволит реализовать стратегию DIVA (обнаружение инфекции у вакцинированных животных) в отношении птиц, вакцинированных такими рекомбинантными вакцинами.

**8.5 Инактивированные вакцины: способы применения**

Инактивированные вакцины против ИББ в основном используются для продуцирования высоких, длительных и равномерных уровней антител у племенных несушек, которых первоначально вакцинировали живой вакциной или подвергли естественному влиянию полевого вируса во время выведения. По обычной программе живую вакцину следует вводить примерно на 8 неделе жизни. После этого проводят вакцинацию инактивированной вакциной на 16 – 20 неделе жизни. Иногда инактивированные вакцины можно использовать в программах, предусматривающих совмещение живых и инактивированных вакцин, в отношении молодых ценных птиц с высокими уровнями материнских антител в тех местностях, где высок риск подверженности вирулентному вирусу ИББ. Инактивированная вакцина производится в виде водно- масляной эмульсии. Ее необходимо вводить каждой птице. Предпочтительный способ введения – внутримышечно в мышцу ноги, избегая областей вблизи суставов, сухожилий или основных кровеносных сосудов и подкожно. Можно использовать многодозовый шприц. Необходимо очищать и стерилизовать оборудование между вакцинацией разных стад, а группы, проводящие вакцинацию, должны строго соблюдать правила гигиены при переходе от одного стада к другому. Вакцину хранят при температуре от 2 °С до 8 °С. Вакцину нельзя замораживать и подвергать воздействию яркого освещения и высокой температуры.

Вакцинируют только птиц, которых ранее подвергли воздействию вируса ИББ. Если следовать всем вышеизложенным требованиям, вакцина продуцирует настолько сильный гуморальный иммунный ответ, что у цыплят, выведенных от этих родителей, пассивный иммунитет к ИББ будет сохраняться примерно до 30 дня жизни. Этот период покрывает то время, когда особь наиболее восприимчива к болезни, и предотвращает повреждение бурсы, когда оно может привести к подавлению иммунитета. Повреждение бурсы, возникшее позднее 15 дня жизни, оказывает слабое влияние на иммунокомпетентность, поскольку к этому времени иммунокомпетентные клетки перемещаются в периферические лимфоидные ткани, но если существует угроза подверженности инфекции очень вирулентным вирусом ИББ, необходимо использовать живую вакцину.

**9 План производства и минимальные требования к производству вакцин**

**9.1 Характеристика посевного материала**

* + 1. Биологические характеристики посевного материала

а) Живые вакцины

Штаммы вируса, используемые для производства живой вакцины против вируса инфекционной бурсальной болезни, иногда называют «слабый», «средний» или «средний плюс»/ «инвазивный» («сильный»), в зависимости от их способности реплицировать на форе возрастающего количества остаточных материнских антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни. Сообразно усилению реплицирующей способности наименее аттенуированных вакцинных штаммов данные штаммы, индуцированные вакциной, приводят к более тяжелым поражениям бурсы (микроскопические поражения и уменьшенный размер) и могут продемонстрировать некоторые остаточные иммуносупрессивные характеристики.

б) Инактивированные вакцины

Для защиты с помощью инактивированного вируса от одного подтипа необходим либо гомологичный антиген, либо высокое содержание антигена.

* + 1. Критерии качества

а) Чистота

В посевном вирусе не должно содержаться инородных вирусов, бактерий, микоплазм и грибков, особенно патогенов птиц. Он должен быть свободен от контаминации другими штаммами вируса ИББ.

б) Отсутствие у живых вакцин возможности возврата к вирулентности.

Для аттенуированных вакцинных штаммов с ограниченными иммуносупрессивными характеристиками посевной вирус должен быть стабильным, без тенденции возврата к вирулентности. Это можно подтвердить путем проведения пассажей в 5 группах СПФ-цыплят с интервалом в 3 – 4 дня, используя суспензию, приготовленную из бурсы, в качестве инокулята на СПФ цыплятах в самом раннем рекомендуемом для вакцинации возрасте. Необходимо показать, что вирус передался: если пассируемый вирус не обнаруживается на соответствующем уровне – необходимо повторить проведение пассажа, используя группу из 10 цыплят. Затем необходимо провести гистологическое сравнение, чтобы показать, что никакой разницы между бурсой птиц, инокулированных материалом первичного и конечного пассажей, нет.

* + 1. Валидация в качестве вакцинного штамма

а) Живая вакцина

Валидация штамма ИББ в качестве живой вакцины требует оценки его безвредности, иммуносупрессивного потенциала, отсутствия возможности возврата данного штамма к вирулентности и его иммуногенности.

Исследование на безвредность можно провести несколькими способами. Некоторые страны рекомендуют вакцинировать СПФ-цыплят в самом раннем рекомендуемом для вакцинации возрасте, используя высокую дозу (десятикратную) наименее аттенуированной вакцины, и затем, после вакцинации, проверить их на отсутствие признаков и наличие умеренных, временных поражений бурсы.

Важной характеристикой, подлежащей оценке, является иммуносупрессивный потенциал. Вакцинный вирус не должен продуцировать такое повреждение бурсы Фабрициуса, которое бы вызвало иммуносупрессию у восприимчивых птиц. Живые вакцины типа «средний» и «средний плюс» могут быть лицензированы. Возможный протокол для экспериментальной оценки иммуносупрессии выглядит следующим образом: десяти 1-дневным СПФ-цыплятам вводят по одной полевой дозе вакцины против вируса ИББ методом инъекции или закапывания в глаза. Две другие группы, состоящие из десяти птиц такого же возраста и из того же источника, содержат отдельно в качестве контролей. На второй неделе жизни каждой птице из группы, вакцинированной против ИББ, и из одной контрольной группы дают по одной полевой дозе вакцины против болезни Ньюкасла путем закапывания в глаза. В качестве альтернативы можно ввести вакцину против вируса ИББ в минимально допустимом для вакцинации возрасте и вакцину против болезни Ньюкасла в то время, когда поражения бурсы, индуцированные вакциной против вируса ИББ, максимальны. Ответ каждой птицы на вакцину против болезни Ньюкасла измеряют с помощью реакции торможения гемагглютинации (HI) через 2 недели после введения вакцины против болезни Ньюкасла, а иммунитет измеряют против контрольного заражения 105.0 – 106.5 ELD50 (50 % летальная доза для эмбриона) штаммом Herts 33/56 (или подобным) вируса болезни Ньюкасла (вторую контрольную группу, которую не вакцинировали против вируса ИББ или вируса болезни Ньюкасла, используют на данном этапе для валидации степени тяжести последствий, вызванных контрольным заражением вирусом болезни Ньюкасла). Вакцина против ИББ не проходит тестирование в случае, если реакция торможения гемагглютинации и иммунитет, полученный благодаря вакцине против болезни Ньюкасла, в группе, которой ввели вакцину против ИББ, значительно ниже, чем в контрольной группе.

Отсутствие у вакцинного штамма потенциала возврата к вирулентности можно оценить, согласно 9.1.2 б).

а) Иммуногенность

Вакцину необходимо вводить птицам тем же способом, который будет использоваться в полевых условиях. Живую вакцину можно использовать в отношении молодых птиц, а и реакцию измерять с помощью серологических методов и путем исследования резистентности к экспериментальному контрольному заражению: одну вакцинную дозу, содержащую минимальный рекомендуемый титр, вводят каждому из 20 СПФ-цыплят минимального рекомендуемого для вакцинации возраста. Разным группам вводят вакцину разными способами. 20 цыплят из того же выводка оставляют в качестве контролей. Через 14 дней проводят контрольное заражение цыплят путем закапывания в глаза вакцины, содержащей примерно 100 CID50 (50 % инфицирующая доза для кур) вирулентного штамма вируса ИББ, как рекомендует одна из Референтных лабораторий МЭБ по ИББ. Цыплят наблюдают в течение 10 дней. Регистрируют количество погибшей птицы и птиц с признаками ИББ. Проводят гистологические исследование бурсы, полученной от цыплят, выживших на 10 день. Вакцина не проходит испытание, если выживает менее 90 % вакцинированных цыплят и если у них наблюдаются клинические признаки или серьезные поражения бурсы Фабрициуса в конце периода наблюдения. Тестирование считается недействительным, если более половины контролей не показывают признаков ИББ, или хотя бы один контроль не показывает серьезных повреждений бурсы Фабрициуса, или контрольные/инокулированные птицы погибают по причинам, не связанным с испытанием. Поражения считаются тяжелыми, если как минимум 90 % фолликулов демонстрирует истощение лимфоцитов более, чем на 75 %, либо если как минимум 51 % фолликулов бурсы имеют гистопатологический балл 3 и более.

б) Инактивированная вакцина

Валидация инактивированных вакцин против вируса ИББ требует оценки их безвредности и иммуногенности.

Безопасность инактивированной вакцины проверяется для всех рекомендуемых путей введения с помощью партии вакцины, активность которой не ниже максимальной активности будущих коммерческих партий. Одну дозу или двойную дозу (для обеспечения максимальной активности) вакцины вводят отрицательным к специфическим антителам или СПФ цыплятам. Вакцинированную птицу в течение 14 дней проверяют на наличие клинических признаков. Вакцина проходит испытание, если клинические признаки не наблюдаются, и в течение периода наблюдения не было случаев гибели, связанных с использованием вакцины. Исследование считается недействительным, если возникают случаи неспецифической гибели.

Эффективность инактивированных вакцин против ИББ оценивают на птице более старшего возраста, когда они могут откладывать яйца, следуя рекомендуемой схеме вакцинации, так их потомство можно подвергнуть контрольному заражению для установления их резистентности по причине наличия материнских антител в начале и в конце яйцекладки.

Как минимум 20 непримированным СПФ цыплятам вводят одну дозу вакцины в рекомендуемом возрасте (ближе к началу яйцекладки) как минимум одним из способов, в качестве альтернативы можно протестировать по одной дозе вакцины каждым из рекомендуемых способов, указанных на этикетке, используя для каждого способа введения по 20 непримированных СПФ цыплят. Гуморальный ответ измеряют в промежутке между 4 и 6 неделями после вакцинации с помощью нейтрализации сыворотки по отношению к стандартной антисыворотке.

Яйца для выведения собирают через 5 – 7 недель после вакцинации, и затем проводят контрольное заражение 25 цыплят из потомства на 3-й неделе их жизни путем закапывания в глаза примерно 100 CID50 признанного вирулентного штамма вируса ИББ. Проводят контрольное заражение десяти контрольных цыплят той же породы, но полученных от не вакцинированных родителей. Уровень иммунитета оценивают через 3 – 4 дня после контрольного заражения путем удаления бурсы Фабрициуса из каждой птицы, проводят гистологическое исследование каждой бурсы или исследуют их на наличие антигена ИББ с помощью реакции преципитации в агаровом геле. Признаки инфицирования ИББ должны проявиться не более, чем у трех цыплят от вакцинированных родителей, и у всех цыплят от не вакцинированных родителей.

Данные процедуры повторяют ближе к концу периода яйцекладки, когда возраст вакцинированных птиц составляет, как минимум, 60 недель, но в этом случае контрольное заражение потомства должно проходить в возрасте 15 дней.

Если планируется использовать инактивированную вакцину в качестве бустерной после примирования – испытание на эффективность необходимо повторить на примированных птицах, вакцинированных в соответствии с рекомендованной схемой. Последняя доза убитой вакцины вводится в самом раннем рекомендуемом возрасте. Цыплят, выведенных из фертильных яиц, собранных в начале и в конце периода яйцекладки, проверяют на иммунитет против контрольного заражения.

**9.2 Методы производства**

9.2.1 Процедура

Посевной вирус можно размножать в различных системах культур, таких как фибробласты эмбрионов СПФ цыплят или куриные эмбрионы. В некоторых случаях размножение можно проводить в бурсе. Массу разделяют на аликвоты и лиофилизируют в герметически закупоренных контейнерах.

Вакцину производят в подходящем чистом и безопасном помещении, отделенном от диагностических помещений или помещений, где содержится коммерческая птица.

Производство вакцины должно быть основано на серии посевного материала с использованием подходящего штамма вируса известного происхождения и с известной историей пассажей. Живые вакцины производят путем выращивания в яйцах или культурах клеток. Инактивированные вакцины против ИББ можно производить путем выращивания вирулентного вируса в бурсе молодых птиц или с помощью аттенуированных, адаптированных в лабораторных условиях штаммов вируса ИББ, выращенных в культуре клеток или в эмбриональных яйцах. Требуется высокая концентрация вируса. Инактивированные вакцины можно производить в виде эмульсий различного вида. Обычно водно-масляная эмульсия состоит из 80 % минерального масла, 20 % суспензии материала бурсы в воде с добавлением подходящих эмульгирующих веществ, хотя есть вакцины, приготовленные в виде двойных эмульсий или микроэмульсий.

* + 1. Требования к ингредиентам

а) Ингредиенты животного происхождения

Все ингредиенты животного происхождения, включая сыворотку и клетки, должны пройти проверку на наличие жизнеспособных бактерий, вирусов, грибов и микоплазм. Ингредиенты животного происхождения должны быть получены из страны с незначительным риском губкообразной энцефалопатии КРС (ГЭ КРС).

Для размножения вируса и тестирования вакцины можно использовать только СПФ-яйца.

б) Консерванты

Для вакцин, фасуемых в многодозовые контейнеры, может потребоваться добавление консервантов. Необходимо провести проверку концентрации консерванта в конечной вакине и ее эффективность до окончания срока годности. Необходимо использовать консерванты, которые разработаны специально для данной цели.

* + 1. Контроль в процессе производства

9.2.3.1 Содержание антигена

Вирус выращивают до высокой концентрации, а его титр исследуют, используя культуры клеток, эмбрионов или цыплят, в соответствии с используемым штаммом. Количество антигена, необходимое для производства удовлетворительных партий вакцины, должно быть основано на результатах определения тестовой вакцины, которая показала свою эффективность в лабораторных и полевых испытаниях.

9.2.3.2 Инактивация инактивированных вакцин

Данную процедуру часто проводят с помощью β-пропиолактона или формалина. Инактивирующий агент и процедура инактивации должны происходить так, чтобы производитель вакцины мог инактивировать вакцинный вирус и исключить возможность контаминации, например, бактериями, которые могут появиться из исходного материала.

До инактивации необходимо убедиться в том, что гомогенная суспензия свободна от частиц, в которые не может проникнуть инактивирующий агент. Тестирование на инактивацию необходимо проводить для каждой партии как при сборе клеток после инактивации, так и при получении конечного продукта. Можно протестировать инактивацию только при сборе клеток после инактивации или только при получении конечного продукта. Выбранный метод тестирования должен соответствовать используемому вакцинному вирусу и должен включать как минимум два пассажа в восприимчивой культуре клеток, эмбрионах или цыплятах, с десятью повторами на один пассаж. Не должно наблюдаться наличие каких-либо живых вирусов или микроорганизмов.

9.2.3.3 Стерильность инактивированных вакцин

Масло, используемое в вакцине, необходимо стерилизовать нагреванием до 160 °С в течение 1 часа или путем фильтрации, необходимо показать эффективность процедуры. Исследования, подходящие для масляно-эмульсионных вакцин, проводят в отношении каждой партии конечной вакцины.

# 9.2.4 Тестирование партии конечного продукта

а) Тестирование живой вакцины на безопасность

Десять полевых доз вакцины вводят путем закапывания в глаза каждому из 15 СПФ-цыплят в минимальном рекомендуемом для вакцинации возрасте, но не старше двух недель. За цыплятами наблюдают в течение 21 дня. Если более двух цыплят погибают по причинам, не связанным с использованием вакцины, испытание необходимо повторить. Вакцина не проходит испытание, если хотя бы один цыпленок погибает или демонстрирует признаки в результате использования вакцины. Тестированию подвергается каждая партия конечной вакцины, если только контроли на более ранних стадиях производства, дополненные соблюдением принципов GMP, не гарантируют безопасность всего процесса.

# б) Посторонние вещества в инактивированных вакцинах

10 – 21 СПФ-птиц в возрасте 14-28 дней инокулируют рекомендованной дозой или двойной полевой дозой рекомендуемым способом. За птицами наблюдают в течение 3-х недель. Не должно развиваться никаких аномальных локальных или системных реакций. Не должно быть антигенов против каких-либо других птичьих патогенов, за исключением вакцинного антигена. Тестированию подвергается каждая партия конечной вакцины, если только контроли на более ранних стадиях производства, дополненные соблюдением принципов GMP, не гарантируют безопасность всего процесса.

в) Остаточная живая вакцина в инактивированных вакцинах

Процесс по 9.2.3можно проводить в отношении каждой партии конечного продукта.

г) Иммуногенность

# д) Тестирование живой вакцины на иммуногенность

Испытание на иммуногенность (титрация вируса) в яйцах или культуре клеток следует проводить для каждой серии произведенной вакцины.

# а) Испытание инактивированной вакцины на иммуногенность

Каждого из десяти СПФ-цыплят, примерно 4-недельного возраста, вакцинируют одной дозой вакцины рекомендуемым способом. Десять других контрольных птиц из того же источника и того же возраста держат вместе с вакцинированными. Реакцию антител каждой птицы определяют через 4 – 6 недель после вакцинации с помощью реакции вирус нейтрализации со ссылкой на стандартную антисыворотку. Средний уровень антител у вакцинированных птиц не должен быть значительно ниже уровня, зафиксированного в ходе испытания на иммуногенность. У контрольных птиц не должно наблюдаться антител. Данное испытание необходимо проводить для каждой серии конечной вакцины.

# **9.3 Требования к авторизации/регистрации/лицензированию**

9.3.1 Процесс производства

Для регистрации вакцины необходимо предоставить в компетентные органы все необходимые данные, касающиеся производства вакцины и контроля качества (см. 9.1 и 9.2). Такие данные должны быть предоставлены в отношении трех последовательных партий, объем которых должен составлять не менее 1/3 объема обычной производственной партии.

# 9.3.2 Требования к безопасности

9.3.2.1 Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Живые аттенуированные вакцины против ИББ с высокой способностью к репликации и потенциалом индуцировать истощение лимфоидной ткани в бурсе обычно лицензируют для использования в отношении животных с высокими титрами материнских антивирусных (ИББ) антител в хозяйствах, подверженных высокому давлению инфекций высокопатогенными вирусами. Данная информация, при необходимости, должна быть отражена в инструкциях по применению вакцины.

Информация об отрицательном воздействии на нецелевые виды животных должна быть представлена в инструкции по применению вакцины.

9.3.2.2 Возврат к вирулентности аттенуированных/живых вакцин и воздействие на окружающую среду

Перед лицензированием необходимо провести оценку потенциала живых вакцин против ИББ возвращаться к вирулентности.

Касательно воздействия на окружающую среду, при лицензировании следует учитывать знания о том, какие штаммы вируса ИББ циркулируют в местности, где будет использоваться лицензируемая вакцина, поскольку такие знания могут помочь при:

а) выборе вакцин, подходящих для контроля данных штаммов;

б) принятии решения относительно обоснованности включения аттенуированного вакцинного штамма вируса ИББ, который может сильно отличаться от местных штаммов вируса ИББ.

9.3.2.3 Меры предосторожности (факторы риска)

Масляно-эмульсионные вакцины могут причинить серьезный вред здоровью вакцинатора при случайном введении в руку или другие ткани. В случае возникновения такой ситуации необходимо незамедлительно обратиться в больницу, взяв с собой упаковку от вакцины. Каждый флакон и упаковка должны содержать четкое предостережение о возникновении серьезных последствий в случае непреднамеренного причинения себе вреда.

# 9.3.3 Требования к эффективности

Испытания, схемы контрольного заражения и критерии оценки эффективности вакцин против ИББ описаны в 9.1.3. При оценке эффективности модели контрольного заражения вирусом ИББ рекомендуется выбрать такой вирус, который бы представлял актуальные штаммы вируса ИББ, циркулирующие в местности, где будет использоваться лицензируемая вакцина.

# 9.3.4 Вакцины, позволяющие проведение стратегии DIVA

Среди вакцин при реализации стратегии DIVA можно использовать живые рекомбинантные векторные вакцины, экспрессирующие белок VP2 вируса ИББ, и субъединичные вакцины, содержащие белок VP2 в качестве единственного антигена вируса ИББ. У цыплят, вакцинированных такими вакцинами, будут вырабатываться только анти-VP2 антитела, в то время у птиц, зараженных вирусом ИББ будет наблюдаться более обширный ответ антител, направленный на все антигены вируса ИББ, включая белок VP3 (рибонуклеопротеин вируса ИББ). На основании наличия только анти-VP2 антител или анти-VP2 и VP3-антител можно дифференцировать птиц, которые были вакцинированы только такой вакциной и инфицированных птиц. Реализация стратегии DIVA требует проведения ИФА, который позволяет провести дифференциальное исследование данных двух типов гуморального иммунного ответа. Несмотря на то, что коммерческие ИФА могут показывать различную чувствительность к данным двум типам антител, о валидации коммерческих исследований для данных целей в научной литературе не говорится.

# 9.3.5 Продолжительность иммунитета

Повторная оценка эффективности инактивированных вакцин в отношении племенных птиц сразу после начала и в самом конце периода яйцекладки может помочь при оценке необходимости проведения бустерной вакцинации в период яйцекладки для обеспечения потомства более длительным иммунитетом.

# 9.3.6 Стабильность

В отношении трех партий вакцины необходимо представить доказательство того, что вакцина прошла испытание партии на иммуногенность при требуемом сроке годности или спустя 3 месяца после его окончания.

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** птица сельскохозяйственная, болезнь Гамбора, вакцина, антитела,идентификация возбудителя, описание болезни, диагностика, биобезопасность |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** птица сельскохозяйственная, болезнь Гамбора, 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.** |