Изображение Государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВЕЗИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ 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 Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**3**Настоящий стандарт разработан с учетом требований   
Руководства Международного эпизоотического бюро (МЭБ) Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных

**4**В настоящем стандарте реализованы нормы Приказа Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 июня 2014 года №16-07/332, «Об утверждении Правил планирования и проведения ветеринарных мероприятий против особо опасных болезней животных», зарегистрированного в Министерстве юстиции Республики Казахстан 29 июля 2014 года № 9639

**5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Документы по стандартизации», а текст изменений и поправок – в периодически издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в периодически издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты».*

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.

**Предисловие**

Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (Руководство по наземным животным) призвано предотвращать и контролировать болезни животных, включая зоонозы, способствовать совершенствованию ветеринарных служб по всему миру, а также обеспечивать безопасную международную торговлю животными и продуктами животноводства. Основная целевая аудитория – лаборатории, проводящие ветеринарные диагностические тесты и надзор, плюс производители и потребители вакцин и регламентирующие органы стран-членов. Основная цель – предоставить согласованные на международном уровне методы и требования лабораторной диагностики для производства и контроля соответствующих вакцин и прочих биологических продуктов.

Эта амбициозная задача потребовала объединения широко известных ветеринарных специалистов из многих стран. МЭБ, Всемирная организация по охране здоровья животных, получила от стран-членов МЭБ мандат на решение этой задачи на глобальном уровне. Основными видами деятельности этой организации, учрежденной в 1924 году и объединившей к 2016 году 180 стран и территорий, являются следующие:

1. Обеспечить транспарентность глобальной ситуации по болезням животным и зоонозам.

2. Собирать, анализировать и распространять научную ветеринарную информацию о методах контроля болезней животных.

3. Предоставлять заключения специалистов и способствовать международной солидарности при контроле болезней животных.

4. Защищать мировую торговлю посредством опубликования санитарных стандартов для международной торговли животными и продуктами животноводства в рамках полномочий, предусмотренных в Соглашении ВТО (Всемирная организация торговли) о применении санитарных и фитосанитарных мер (СФС Соглашение).

5. Усовершенствовать законодательные рамки и ресурсы национальных ветеринарных служб.

6. Обеспечивать более высокие гарантии безопасности продуктов животного происхождения, а также способствовать благополучию животных посредством научно-обоснованных подходов.

Руководство по наземным животным, охватывающее инфекционные и паразитарные болезни млекопитающих, птиц и пчел, было впервые опубликовано в 1989 году. В каждой последующей редакции предоставляемая информация расширялась и усовершенствовалась: в Части 1 содержится вводная глава, в которой установлены общие стандарты контроля ветеринарных диагностических лабораторий и объектов по производству вакцин; в Части 2 объединены специальные рекомендации, и она включает восемь новых глав о рекомендациях в отношении валидации диагностических тестов и три новых главы о рекомендация по производству вакцин; в Части 3 объединены главы по болезням списка МЭБ и другим значимым болезням; и Часть 4 – список референтных центров на момент публикации (Список референтных центров обновляется Всемирной ассамблеей делегатов (стран-членов МЭБ) каждый год; пересмотренный список представлен на сайте МЭБ).

В качестве дополнительного тома к Ветеринарно-санитарному кодексу по наземным животным, Наземное руководство устанавливает лабораторные стандарты по всем болезням списка МЭБ, а также по нескольким другим болезням мирового значения. В нем описаны применимые диагностические тесты, включая тесты, которые подходят для сертификации отдельных животных перед перемещением. Наземное руководство стало широко распространено в качестве ключевого справочника для ветеринарных лабораторий по всему миру. Болезни водных животных включены в отдельное Руководство по водным животным.

Всемирная ассамблея национальных делегатов возложила задачу по подготовке глав и компоновке Наземного руководства на Комиссию МЭБ по биологическим стандартам. Рукописи были запрошены от специалистов (назначенные МЭБ эксперты в референтных лабораториях МЭБ, если целесообразно) по каждой болезни или по другим рассматриваемым темам. Иногда собирали специальные группы экспертов, которым давали задание актуализировать или разработать статью. После первоначального изучения техническим редактором-консультантом Комиссия по биологическим стандартам направляла главы в страны-члены МЭБ для изучения и комментариев. Прежде чем закончить главы и во второй раз направить их во все страны-члены Комиссия, избираемая на Ассамблее каждые три года, в сотрудничестве с техническим редактором-консультантом, рассмотрели все итоговые комментарии, зачастую обращаясь к авторам за дополнительной помощью. Затем итоговый текст представляли для утверждения Ассамблеей на Генеральной сессии, которая проводится в мае каждого года.

Процедура официального признания коммерческих диагностических тестов под руководством Ассамблеи была закончена в сентябре 2004 года. Данные представлены с использованием модели валидации, которая разработана Комиссией по биологическим стандартам. Предоставленные данные оценивают назначенные эксперты, которые дают рекомендации Комиссии по биологическим стандартам до обращения во Всемирную Ассамблею МЭБ для получения итогового заключения. Всю информация о подаче заявок можно получить на сайте МЭБ. <https://rr-europe.woah.org/ru>

**Введение**

Везикулярная болезнь свиней (ВБС) может носить субклинический, легкий и тяжелый характер в зависимости от вызывающего болезнь штамма вируса, пути заражения и инфицирующей дозы, а также от условий, в которых содержатся свиньи. При клиническом проявлении, ВБС может быть неотличима от ящура, поэтому необходимо срочно провести дифференциальную диагностику и лабораторные исследования. Однако в нынешнем столетии, вспышки ВБС были менее серьезными или не сопровождались клиническими признаками, а инфекция обнаруживалась при исследовании образцов в рамках программ серонадзора или при сертификации экспорта.

После первого обнаружения в 1966 году, болезнь протекала с эпидемиями в Восточной и Западной Европе (в течение 1970-х и 1980-х годов), а также была обнаружена в Восточной Азии. С тех пор о ВБС сообщалось лишь спорадически, в основном из Италии, где ее циркуляция изучается и контролируется с помощью плана вирусологического и серологического надзора.

Инкубационный период при ВБС составляет от 2 до 7 дней, после чего может возникнуть преходящая лихорадка до 41°C. После этого на копытном венчике, как правило, в месте его соединения с пяткой, образуются везикулы. Следствием этого может стать поражение всего копытного венчика, что может привести к потере копыта. В более редких случаях, везикулы могут образовываться также на морде, в частности, на ее дорсальной поверхности, на губах, языке и сосках, а на коленях могут появляться неглубокие эрозии. В течение нескольких дней у пораженных вирусом свиней может наблюдаться хромота и потеря аппетита. Выкидыш не является типичным следствием ВБС. Восстановление обычно завершается через 2­3 недели. Зараженные свиньи могут выделять вирус из носа и изо рта, а также вместе с экскрементами до 48 часов до появления клинических симптомов. Наибольшее количество вируса производится в течение первых 7 дней после заражения, а выделение вируса из носа и изо рта обычно прекращается в течение 2 недель. Вирус может сохраняться в фекалиях до 3 месяцев, хотя в обычных условиях вирус обнаруживается в фекалиях только в течение 1 месяца. Вирус ВБС крайне устойчив к воздействию факторов инактивации в окружающей среде, и его состояние остается стабильным при значении pH-уровня от 2,5 до 12,0. Это отличает его от вируса ящура, который является очень неустойчивым во внешней среде при значении pH-уровня от 6,0 до 8,0.

Поскольку ВБС может протекать в легкой или субклинической форме, очень важно, чтобы при предоставлении образцов, собранных у животных, у которых имеются подозрение на развитие клинической формы болезни, предоставлялись образцы сыворотки, полученные как у свиней с подозрением на заражение, так и у других, не имеющих очевидных признаков болезни животных. Вирус ВБС может циркулировать, оставаясь необнаруженным до тех пор, пока он не поразит чрезвычайно чувствительную группу. Исходя из этого, для установления длительности присутствия инфекции в организме, необходимо искать признаки сероконверсии к вирусу ВБС у здоровых по внешним признакам животных. Определение изотипа иммуноглобулинов (M или G) к вирусу ВБС также может помочь в установлении времени заражения.

Вирус ВБС был классифицирован, как свиной вариант человеческого коксакивируса B5 (*Enterovirus B*), относящегося к семейству *Picornaviridae.* Все изоляты этого вируса относятся к одному серотипу, имеющему четыре различных антигенных/геномных варианта, которые последовательно развиваются в различные периоды времени, не пересекаясь друг с другом, за исключением третьего и четвертого вариантов, одновременная циркуляция которых наблюдалась в Италии с 1992 по 1993 год. Все вирусы ВБС, обнаруживаемые с того времени, выделились из единого источника и кластера в уникальную антигенную/геномную линию, соответствующую четвертой и большинству последних групп; тем не менее, внутри этой линии различаются две геномные сублинии. Антигенно и генетически вирус ВБС тесно связан с вирусом Коксаки человека B5, и было высказано предположение, что он возник в результате рекомбинации с другим энтеровирусом человека, вирусом Коксаки A9. В 1975 году в России сообщалось о второй адаптации человеческого энтеровируса, вызывающего везикулярную болезнь свиней, с участием вируса Коксаки B4, который серологически отличается от вируса ВБС/CV-B5.

Имеются сообщения о сероконверсии к вирусу ВБС у сотрудников лаборатории, работавших с этим возбудителем болезни. Согласно сообщениям, клиническая болезнь протекала в мягкой форме за исключением единственного случая развития менингита, связанного с заражением вирусом ВБС, и не было зарегистрировано случаев сероконверсии или заболевания у фермеров или ветеринаров, работающих с инфицированными свиньями. В экспериментальных условиях, не представлялось возможным продемонстрировать процесс передачи вируса Коксаки B5 между свиньями. Лабораторные манипуляции должны проводиться на соответствующем уровне биобезопасности и изоляции, определяемом анализом биологического риска [2].

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВЕЗИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ**

**Основные положения**

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

**1 Область применения**

Настоящий стандарт содержит основные положения по определению лабораторной диагностики заболевания везикулярной болезнью свиней, а также устанавливает требования к их лабораторной диагностике.

Настоящий стандарт распространяется на свиней, заразившихся везикулярной болезнью (ВБС), которая может носить субклинический, легкий и тяжелый характер в зависимости от вызывающего болезнь штамма вируса, пути заражения и инфицирующей дозы, а также от условий, в которых содержатся свиньи.

Стандарт применяют при диагностировании заболевания везикулярной болезнью свиней в лабораториях ветеринарных научно-исследовательских учреждений.

**2 Термины и определения**

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями:

**Анализ биологического риска**:Процесс, включающий в себя идентификацию биологической опасности, оценку биологического риска, управление биологическим риском и информирование о биологическим риске.

**Атаксия:** Расстройство координации движений. Сила в конечностях незначительно снижена или сохранена полностью.

**Альфавирусы:** Род [РНК-вирусов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%9D%D0%9A-%D1%81%D0%BE%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%B6%D0%B0%D1%89%D0%B8%D0%B5_%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B" \o "РНК-содержащие вирусы), единственный род в семействе Togaviridae. Альфавирусы принадлежат к группе IV [Балтиморской классификации](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%BE%D0%B2_%D0%BF%D0%BE_%D0%91%D0%B0%D0%BB%D1%82%D0%B8%D0%BC%D0%BE%D1%80%D1%83" \o "Классификация вирусов по Балтимору) [вирусов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B) с [одноцепочечным](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%9E%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B5%D0%BF%D0%BE%D1%87%D0%B5%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%A0%D0%9D%D0%9A-%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B_%D1%81_%D0%BF%D0%BE%D0%B7%D0%B8%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%BE%D0%B9_%D1%86%D0%B5%D0%BF%D1%8C%D1%8E&action=edit&redlink=1" \o "Одноцепочечные РНК-вирусы с позитивной цепью (страница отсутствует)) геномом (+) [РНК](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0). Существует 32 альфавируса, которые заражают различных [позвоночных](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%B7%D0%B2%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5), таких как люди, грызуны, рыбы, птицы и более крупных млекопитающих, таких как лошади, а также [беспозвоночных](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%BE%D0%B7%D0%B2%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5).

**Биологическая опасность (адаптировано из CWA 15793:2011):** Потенциальный источник вредного воздействия, оказываемого биологическими агентами и токсинами.

Примечание – CWA, Соглашение Рабочей группы CEN (2011).

**Биологический агент (адаптировано из CWA 15793:2011):** Все микроорганизмы, в том числе генетически модифицированные организмы, клеточные культуры и паразиты, которые способны вызывать инфекцию, аллергическую или токсическую реакцию у людей, животных или растений.

Примечание - В целях Анализа Биорисков прионы считаются биологическим агентами.

**Биобезопасность:** Лабораторная биобезопасность описывает принципы и практические методы, направленные на предупреждение непреднамеренных контактов с биологическими материалами или их случайной утечки.

**Биозащита:** Лабораторная биозащита описывает контроль биологических материалов в лабораториях с целью предупреждения их утери, кражи, неправильного использования, несанкционированного доступа или преднамеренной несанкционированной утечки.

**Биориск (адаптировано из CWA 15793:2011):** Сочетание вероятности возникновения и тяжести вредного воздействия, если источником такого воздействия является биологический агент или токсин.

Примечание: Источником вредного воздействия может быть непреднамеренное воздействие, случайная утечка или утеря, кража, ненадлежащее использование, диверсия, несанкционированный доступ или преднамеренная несанкционированная утечка.

**Безопасность:** Отсутствие свойств, вызывающих ненадлежащие местные или системные реакции при использовании в соответствии с рекомендациями или инструкциями производителя и без известного риска для контактирующих животных, людей или окружающей среды.

**Вакцина:** Включает все продукты, разработанные для стимуляции активной иммунизации животных от болезни безотносительно типа микроорганизма или микробного компонента или токсина, из которого они могут быть получены, или который они могут содержать.

**Валидация:** Процесс, определяющий соответствие целевому назначению анализа, который надлежащим образом разработан, оптимизирован и стандартизирован.

**Внутренние проверки:** Все мероприятия по обеспечению качества в рамках лаборатории, связанные непосредственно с мониторингом, валидацией и поддержанием рабочих характеристик анализа и технической профессиональной подготовки.

**Воспроизводимость:** Способность метода тестирования обеспечивать достоверные результаты в отношении аликвот одной и той же пробы, протестированной одним и тем же методом в разных лабораториях.

**Гармонизация:** Результат соглашения между лабораториями для калибровки похожих методов тестирования, корректировки пороговых значений диагностических методов и выражения данных тестирования способом, обеспечивающим единообразную интерпретацию результатов между лабораториями.

**Готовый продукт (партия):** Все запечатанные готовые контейнеры, в которые фасовали одну однородную партию вакцины в ходе одной рабочей смены, лиофилизированные в ходе одной непрерывной процедуры (если применимо), укупоренные во время одной рабочей смены и идентифицированные уникальным кодовым номером.

**Гемагглютинация:** Процесс склеивания и последующего осаждения эритроцитов крови; вызывается [гемагглютининами](https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/009/225.htm), бактериями и вирусами, агентами, способными адсорбироваться на поверхности эритроцитов.

**Дендритные отростки:** Разветвлённый отросток нейрона, который получает информацию через химические (или электрические) синапсы от аксонов (или дендритов и сомы) других нейронов и передаёт её через электрический сигнал телу нейрона (перикариону), из которого вырастает.

**Ингибирование:** Торможение химических реакций в пламени, обусловленное гибелью активных центров (радикалов и атомарных частиц, имеющих свободные валентности) в результате воздействия на них специальных веществ (ингибиторов).

**Инцидентность:** Оценка частоты новых инфекций в восприимчивой популяции в течение определенного периода времени.

**Исходные посевные клетки (линия, посев, расплодка):** Коллекция аликвот клеток определенного уровня пассажа для использования при приготовлении или тестировании биологического продукта, которые распределили в контейнеры во время одной операции, обработали вместе и хранят таким образом, чтобы обеспечить единообразие и стабильность и предотвратить контаминацию.

**Исходный вирус (возбудитель, штамм):** Коллекция аликвот организма определенного уровня пассажа, из которых получают все другие посевные пассажи, полученные из одной обшей партии, распределенные в контейнеры во время одной операции, обработанные вместе и хранящиеся таким образом, чтобы обеспечить однородность и стабильность и предотвратить контаминацию.

**Иммуногенность:** Иммуногенность биологического продукта – концентрация иммунологически активного компонента. В случае вакцины это концентрация специфического иммуногена, а в случае антисыворотки – концентрация специфического антитела.

**Информирование о рисках:** Процесс взаимного обмена информацией и мнениями в ходе процедуры анализа риска, предметом которого является сам риск, его факторы и заключения. Информацией обмениваются специалисты, которым поручена оценка риска, управление им и информирование о нем, население и другие заинтересованные участники.

**Линия клеток:** Стабильно трансформированная линия клеток, обладающая высокой способностью к размножению *in vitro*.

**Значение порогового цикла (Ct):** Количество циклов амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, необходимое для того, чтобы сигнал флуоресценции превысил фоновый сигнал.

**Ложноотрицательная (перекрестная) реакция:** Отрицательная реакция в анализе исследуемого образца, полученного от животного, подвергавшегося воздействию или инфицированного определенным организмом, возможно, ввиду отсутствия аналитической чувствительности, ограниченной аналитической специфичности или разложения аналита, снижает диагностическую чувствительность.

**Ложноположительная реакция:** Положительная реакция в анализе, полученная не в результате воздействия или инфицирования определенным организмом, возможно, ввиду иммунологической перекрестной реактивности, перекрестной контаминации исследуемого образа или неспецифичных реакций, снижает диагностическую специфичность.

**Квалификационные испытания:** Одна оценка компетентности лаборатории, полученная путем межлабораторных сличительных испытаний; в данном определении подразумевается, что лаборатории-участники используют одни и те же методы тестирования, реактивы и контроли, и что результат представляется в количественном выражении.

**Качественная оценка риска**: Оценка риска, при которой результаты изучения вероятности эпизоотического происшествия и размеров его последствий выражаются в качественных категориях: повышенный, средний, низкий или незначительный.

**Количественная оценка риска:** Оценка риска, при которой результаты оценки риска выражаются в цифровых значениях.

**Контроль в процессе производства:** Испытания, которые проводятся во время производства биологического продукта для обеспечения соответствия продукта согласованным стандартам качества.

**Комнатная температура:** Термин «комнатная температура» подразумевает температуру комфортной рабочей среды. Точные пределы комнатной температуры установить невозможно, но приблизительные границы составляют 18-25C. Если в тесте указана комнатная температура, ее, при необходимости, следует обеспечить с помощью кондиционирования воздуха; иначе это может отразиться на параметрах тестирования.

**Конвульсия:** Резкое непроизвольное сокращение [мышц](https://ru.wiktionary.org/wiki/%D0%BC%D1%8B%D1%88%D1%86%D0%B0); [судорога](https://ru.wiktionary.org/wiki/%D1%81%D1%83%D0%B4%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B0).

**Лабораторная биобезопасность:** Лабораторная биобезопасность описывает принципы и практику предотвращения непреднамеренного воздействия биологических материалов или их случайного высвобождения.

**Лабораторная биозащита:** Лабораторная биозащита описывает меры контроля за биологическими материалами в лабораториях с целью предотвращения их потери, кражи, неправильного использования, несанкционированного доступа или преднамеренного несанкционированного высвобождения.

**Межлабораторные сравнительные испытания (кольцевые испытания):** Любая оценка рабочих характеристик анализа и/или компетентности лаборатории при тестировании определенных образцов в двух или более лабораториях; одна лаборатория должна выступать в роли референтной при определении характеристик исследуемого образца.

**(Международные) стандартные реактивы:** Стандартные реактивы, по которым калибруют все остальные реактивы и анализы; готовятся и распространяются Международной референтной лабораторией.

**Метод тестирования:** Специальная техническая процедура для выявления аналита (синоним – анализ).

**Мультиплексное выявление вирусных:** Мультиплексный ПЦР тест, направленный на выявление вирусов гепатита B и С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в плазме крови, используемой для получения биопрепаратов.

**Национальные стандартные реактивы:** Стандартные реактивы, калиброванные в сравнении с Международными стандартными реактивами; готовятся и распространяются Национальной референтной лабораторией.

**Пирексия** (лихорадка): Рассматривается как адаптивный ответ на физиологический стресс, который регулируется через эндогенные пирогенные и антипиретические пути и связан с увеличением гипоталамического заданного значения.

**Повторяемость:** Уровень согласованности между репликатами образца как внутри цикла, так и между циклами одного и того же метода тестирования в данной лаборатории.

**Предел обнаружения (LOD):** Расчетное количество аналита в указанной матрице, которое позволит получить положительный результат, по крайней мере в указанном проценте случаев, и которое является мерой аналитической чувствительности.

**Прогнозируемое значение (отрицательное):** Вероятность того, что животное не заражено, учитывая, что тесты отрицательные; прогнозируемые значения – это функция диагностической чувствительности (Dse) и диагностической специфичности (DSp) диагностического анализа и превалентности инфекции.

**Прогнозируемое значение (положительное):** Вероятность того, что животное заражено, учитывая, что тесты положительные; прогнозируемые значения – это функция диагностической чувствительности (DSe) и диагностической специфичности (DSp) диагностического анализа и превалентности инфекции.

**Превалентность:** Оценка процента инфицированных животных в популяции в определенный момент времени; не путать с инцидентностью.

**Первичные клетки:** Пул первоначальных клеток, полученных из нормальной ткани до десятого субкультивирования включительно.

**Производственный посевной вирус:** Организм определенного уровня пассирования, который используется без дальнейшего размножения для запуска подготовки производственной партии.

**Проба:** Материал, который получен из образца и используется для целей тестирования.

**Рабочие характеристики:** Свойства метода тестирования, которые могут включать аналитическую чувствительность и специфичность, точность: и сходимость, диагностическую чувствительность и специфичность и/или повторяемость и воспроизводимость.

**Рабочие характеристики приемника (ROC):** ROC-анализ представляет собой независимый от точки разделения метод оценки глобальной точности теста, при котором результаты измеряются в порядковых значениях или в значениях в непрерывном режиме. Площадь под ROC-кривой представляет собой единую цифровую оценку общей точности в диапазоне от 0,5 (бесполезный тест) до 1 (отличный тест).

**Рабочие стандарты (реактивы):** Стандартные реактивы, калиброванные путем сравнения с национальным стандартным реактивом или – при отсутствии национального стандартного реактива – калиброванные против хорошо охарактеризованного внутреннего стандартного реактива; включены в стандартные диагностические тесты в качестве контроля и/или для нормализации результатов тестов.

**Рабочий посевной вирус:** Организм на уровне пассирования между исходным посевным вирусом и производственным посевным вирусом.

**Референтная лаборатория:** Лаборатория, обладающая признанным научным и диагностическим опытом в области определенной болезни животных и/или метода тестирования; включает возможность для характеристики и присвоения значения референтным реактивам и пробам.

**Риск:** Вероятность возникновения и потенциальный масштаб последствий какого-либо происшествия, способного нанести вред здоровью животных или человека с биологической или экономической точки зрения.

**Сравнение методов (проверка эквивалентности):** Определение конкретных аналитических рабочих характеристик новых или различных методов тестирования посредством межлабораторного сличения со стандартным методом тестирования; в данном определении предполагается, что лаборатории-участники используют свои собственные методы тестирования, реагенты и контроли, и что результаты представляются в количественном выражении.

**Сходимость:** Степень разброса (дисперсия, стандартное отклонение или коэффициент вариаций) в рамках серии измерений одного и того же образца, исследуемого в специфических условиях.

**Свободный от специфических патогенов (СПФ):** Животные, признанные свободными от определенных патогенных микроорганизмов с использованием надлежащих тестов; также это относится к яйцам, полученным от СПФ птиц.

**Специфичность (аналитическая):** Степень, до которой анализ проводит дифференциацию между целевым аналитом и другими компонентами в матрице пробы; чем выше аналитическая специфичность, тем ниже уровень ложноположительных результатов.

**Специфичность (диагностическая):** Процент эталонных, точно не зараженных животных с отрицательным результатом в анализе; неинфицированные эталонные животные с положительными результатами считаются ложноположительными.

**Специфичность (относительная):** Процент эталонных животных, определенных как отрицательные с использованием одного или нескольких методов тестирования, которые также дают отрицательные результаты в анализе при сравнении.

**Субклиническое заболевание или латентная форма гипотиреоза**: Результат угнетения функции щитовидной железы под воздействием различных факторов. На начальном этапе работают компенсаторные механизмы. В ответ на гипофункцию щитовидной железы гипофиз вырабатывает больше тиреотропного гормона.

**Стерильность:** Отсутствие жизнеспособных контаминирующих микроорганизмов, продемонстрированное утвержденными или надлежащими тестами.

**Тепловая инактивация:** 1) необратимая денатурация большинства ферментов при воздействии температурой выше 60 °С, часто используется для остановки действия различных ферментов, используемых в генной инженерии (рестрикционных эндонуклеаз, лигаз и др.); 2) обезвреживание повышенной температурой вирусов и бактерий, содержащихся в продуктах питания, в медицинских препаратах и др.

**Типирование крови**: Несложная процедура, во время которой у донора берут одну пробирку крови до 10 миллилитров – как при обычном анализе крови. Образец исследуют в специализированной лаборатории, определяют набор генов, отвечающих за совместимость и после этого вносят клетки в базу.

**Тесты:**

**- Скрининговые:** Тесты, обладающие высокой диагностической чувствительностью, пригодные для крупномасштабного применения.

- **Подтверждающие:** Методы тестирования, обладающие высокой диагностической специфичностью, которые используются для подтверждения результатов, обычно положительных, полученных с использованием других методов тестирования.

**Термоустойчивый:** Термин используется для описания способности вакцины и/или родительского вируса/штамма сохранять уровень инфекционности после воздействия нагревания, т.е. отложенная термодеградация вируса.

Примечание - Например, в случае термоустойчивой вакцины против болезни Ньюкасла I-2 это определяется периодом времени, в ходе которого вакцина сохраняет титр инфективности, достаточный для индуцирования защитного иммунитета при определенной температуре.

Можно также встретить термин «отложенная термодеградация», но термин «термоустойчивость» предпочтительный. Считается, что термины «терморезистентный» и «термостабильный» создают несбыточные ожидания в отношении свойств вакцины, и их следует избегать.

**Точка разделения/пороговое значение:** При иммунологическом анализе точка разделения или пороговые значения – это значения, которые выбираются для разграничения отрицательных и положительных результатов, и могут включать неопределенную зону или зону с подозрением.

**Транзиторная виремия, вирусемия:** Состояние организма, при котором [вирусы](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81) попадают в кровоток и могут распространяться по всему телу. Аналогично [бактериемии](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%8F), при которой в кровоток попадают бактерии. Вирусемия делает возможной передачу вирусов [трансмиссивным](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%BC%D0%B8%D1%81%D1%81%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BD%D0%B8) путём.

**Чистота:** Качество биологического продукта в готовом виде относительно свободного от инородных микроорганизмов и инородного материала (органического или неорганического) по результатам методов тестирования, подходящих для продукта; и свободного от внешних микроорганизмов или материала, который может отрицательно повлиять на безопасность, иммуногенность или эффективность продукта.

**Чувствительность (аналитическая):** Наименьшее количество аналита, которое можно измерить с определенной долей уверенности; аналит может включать антитела, антигены, нуклеиновые кислоты или живые организмы.

**Чувствительность (диагностическая):** Процент эталонных животных с известным заражением и с положительным результатом в анализе; инфицированные животные с отрицательным результатом в анализах считаются животными с ложноположительными результатами.

**Чувствительность (относительная):** Процент эталонных животных, определенных как положительные с использованием одного или нескольких методов тестирования, которые также дают положительные результаты в анализе при сравнении.

**Фиксация комплемента:** Степень фиксации комплемента указывает на относительное количество антитела в образце. Анализ может измерить титры антитела IgM и IgG или может быть модифицирован, чтобы обнаружить определенные антигены.

**Филогеография:** Исследование генетической или географической структуры популяций и видов.

**Эффективность:** Особая способность биологического продукта продуцировать результат, для которого он предлагается при условии применения в условиях, рекомендованных производителем.

**3 Сокращения**

ВЛЭ, ЗЛЭ и ВенЛЭ - Восточный, западный и венесуэльский энцефаломиелит лошадей

РТ-ПЦР Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

ИФА Иммуноглобулин М иммуноферментный анализ

ИГК Иммуногистохимические процедуры

ПЦР Полимеразная цепная реакция;

RT-PCR ПЦР с обратной транскрипцией

CF Фиксация комплемента

PRN Иммунофлуоресценция или тест на нейтрализацию уменьшения бляшек.

БСА Сывороточный альбумин

ИГК Иммуногистохимические процедуры

ABTS 2,2-азино-ди (3-этил- бензотиазолин) сульфоновая кислота

SAT Реакция агглютинации на стекле;

ТАТ Реакция агглютинации в пробирке;

МАТ Реакция микроагглютинации;

ELISA Твердофазный иммуноферментный анализ.

ЕМТМ Среда Тоби, модифицированная по Эвансу

AGID Иммунодиффузия в агаровом геле

EYL Дрожжевой лактальбумин Эрла

ATCC 1 Американская коллекция типовых культур

РИФ Реакция иммунофлуоресценции

ВВАТ Исследовани с забуференным антигеном Brucella

FAVN Реакция вируснейтрализации флуоресцентными антителами

BCIP 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат

ФБС Фетальная бычья сыворотка

FITC Флуоресцеин изотиоцианат

BGPS Мясо-пептонный сывороточный бульон с глюкозой

FPA Флуоресцентная поляризация

BLP Забуференная лактозо-пептонная вода

g Относительная центробежная сила

ВРАТ Исследование антигена на забуференном планшете

РПР Реакция подавления роста

БСА Бычий сывороточный альбумин

РГА Реакция гемагглютинации

ГС Гемабсорбция

ХАМ Хориоаллантоисная мембрана

HBSS Сбалансированный солевой раствор

САТ Реакция агглютинации на карте

H&E Гематоксилин и эозин (краситель)

ФКЭ Фибробласты куриных эмбрионов

НЕР Многократное пассирование в яйце

РСК Реакция связывания комплемента

НЕРА Высокоэффективный воздушный фильтр

КОЕ Колониеобразующая единица

HEPES 4-(2оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота

ВИЭФ Встречный иммуноэлектрофорез

РТГА Реакция торможения гемагглютинации

СК Почки теленка (клетки)

HRPO Пероксидаза хрена

ЦНС Центральная нервная система

ИБ Иммуноблот анализ

ЦПД Цитопатогенное действие

МЕ РСК Международная единица реакции связывания комплемента

CPLM Цистеино-пептонная мальтоза с печеночным экстрактом (среда)

ICPI Индекс интрацереабральной патогенности

CSY Казеино-сахарозно-дрожжевой агар

ID50 Средняя инфицирующая доза

Сt Пороговый цикл (ПЦР исследования)

РНИФ Реакция непрямой иммунофлюоресценции

DEPC Диэтилпилокарбонат

IGRA Тест, основанный на определении высвобождения гамма-интерферона

DIVA Выявление инфекции среди вакцинированных животных

РНГА Реакция непрямой гемагглютинации

DMEM Модифицированная по методу Дульбекко среда

IPMA Монослойный иммунопероксидазный анализ

DMSO Диметил сульфид

МЕ Международная единица

DTH Гиперчувствительность замедленного типа

IVPI Индекс внутривенной патогенности

ЭДТК Этилендиаминтетрауксусная кислота

LA Агглютинация латекса

ЭГТК Этиленгликоль тетрауксусная кислота

LD Летальная доза

EID Доза, инфицирующая яйцо

LEP Кратковременное пассирование в яйце

ИФА Иммуноферментный анализ

ЛПС Липополисахарид

MAb Моноклональное антитело

БОЕ Бляшкообразующая единица

МРА Микроскопическая реакция гемагглютинации

РПГА Реакция пассивной гемагглютинации

MCS Банк исходных клеток

PPD Очищенный белковый продукт

MDBK Клетки Мадин-Дарби почек

КРС Клеточная линия

PPLO Плевропневмония-подобный организм

MDT Среднее время гибели

НБО Реакция нейтрализации бляшкообразования

МЕМ Минимальная обогащенная среда

PSG Фосфатно-буферный солевой раствор глюкозы

ГКГС Главный комплекс гистосовместимости

RBC Красные кровяные тельца

MLV Модифицированный живой вирус (вакцинный)

ПДРФ Полиморфизм длины фрагментов рестрикции

m.o.i. Множественность заражения

MSV Исходный посевной вирус

Об/мин Оборотов в минуту

NI Индекс нейтрализации

RSA Экспресс реакция сывороточной агглютинации

NBT Нитросиний тетразолий

ОТ-ПЦР Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

NPLA Анализ связанной пероксидазы

SAT Реакция сывороточной агглютинации

ОП Оптическая плотность

SDS Додецилсульфат натрия

OGP 1-октил-бета-D-глюкопиранозид (буфер)

СОП Стандартная операционная процедура

OPD Ортофенилендиамин (хромоген)

СПФ Свободный от патогенных факторов

OPG Оксалаза-фенол-глицерин (консервирующий раствор)

SPG Сахароза-фосфат-глутаминовая кислота

ОРС Открытая рамка считывания

SRBC Эритроциты овцы

ПААГ Электрофорез

ТЦД50 Электрофорез в полиакриламидном геле

50 % Средная инфицирующая тканевую культуру доза

ПАП Пероксидаза-антипероксидаза (процедура окрашивания)

ТМБ Тетраметилбензидин

ШИК-реакция Реакция Шифф-йодная кислота

TSI Тройной сахарный железосодержащий агар

ФБР Фосфатно-буферный раствор

VB Вероналовый буфер

VBS Вероналовый буферный солевой раствор

PD Защитная доза

Vero Клетки почки африканской зеленой мартышки

PFGE Гель-электрофорез в пульсирующем поле

РВН Реакция вируснейтрализации

**4 Описание заболевания**

Везикулярная болезнь свиней (ВБС) – это заразная болезнь свиней, вызываемая энтеровирусом, характерным признаком которой является появление везикул на копытных венчиках, пятках и, в отдельных случаях, на губах, языке, морде и сосках. Штаммы вируса ВБС (ВБСВ) различаются по вирулентности, и болезнь может быть субклинической, легкой или тяжелой, причем последняя обычно наблюдается только при содержании свиней на абразивных полах во влажных условиях. Основное значение заключается в том, что клинически она может быть неотличима от ящура, и любые вспышки везикулярной болезни у свиней должны приниматься за ящур, пока не будут проведены лабораторные исследования и не будет доказано обратное. Однако в последние годы наиболее часто наблюдается субклиническая инфекция.

**4.1 Диагностические методы**

Таблица 1. Методы исследования, применяемые для диагностики везикулярной болезни

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Цель | | | | | |
| Метод | Не зараженная популяция | Отсутствие заражения отдельных особей до перемещения | Участие в политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Распространенность заражения - наблюдение | Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации |
| **Идентификация агента** | | | | | | |
| Выделение вируса | - | + | + | +++ | - | н/д |
| ОТ-ПЦР | - | +++ | +++ | +++ | - | н/д |
| ИФА для определения антигена | - | - | - | +++ | - | н/д |
| **Выявление иммунной реакции** | | | | | | |
| Нейтрализация вируса | + | +++ | + | + | + | н/д |
| Конкурентный  твердофазный ИФА для скрининга  антител | +++ | +++ | +++ | + | +++ | н/д |
| Твердофазный ИФА для идентификации иммуноглобулина G и иммуноглобулина M | + | +++ | +++ | + | + | н/д |

Где,

+++ рекомендуется для этой цели;

++ рекомендуется, но имеет ограничения;

+ подходит в очень ограниченных обстоятельствах;

- не подходит для этой цели.

Примечание - При выборе анализов, подходящих для различных целей, следует учитывать различную кинетику диагностических мишеней (агента и антител) во время инфекции.

**5** **Идентификация возбудителя**

Любое везикулярное состояние у свиней может представлять собой инфекцию ящура, поэтому необходимо проводить дифференциальную диагностику между ящуром и другими везикулярными состояниями, включая ВБС. Для диагностики СВД требуется оборудование специализированной лаборатории. Странам, у которых нет такого учреждения, следует направить образцы для исследования в референс-лабораторию МЭБ на наличие ВБС (веб-сайт МЭБ для получения наиболее актуального списка: [http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories /)](http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/).

В клинических случаях, выявление антигенов или генома вируса ВБС с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) имеет такое же диагностическое значение, как и выделение вируса. По скорости ИФА и ОТ-ПЦР можн проводить подходящие скрининговые тесты. Выделение вируса является эталонным методом, который необходимо использовать в тех случаях, когда положительный результат твердофазного ИФА или ПЦР ОТ не связан с обнаружением клинических симптомов болезни, обнаружением сероположительных свиней или прямой эпидемиологической связи с подтвержденной вспышкой болезни.

В случае наличия клинических симптомов, исследование необходимо начинать с проверки 10% суспензии материала пораженной ткани, разведенной в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) или в среде из культуры клеток ткани и антибиотиков. Образцы экскрементов используются по желанию для обнаружения вируса в тех случаях, когда имеются подозрения на наличие клинической формы ВБС. Образцы экскрементов могут быть собраны у отдельных свиней или с пола помещения, в котором, согласно имеющейся информации, содержатся или содержались свиньи, зараженные ВБС. Количество вируса в экскрементах обычно бывает незначительным для его обнаружения методом твердофазного ИФА, и необходимо использовать метод ПЦР ОТ и/или метод выделения вируса. Значительная доля образцов экскрементов, помещенных в культуры клеток, будет способствовать росту других энтеровирусов. Вирусы могут быть дифференцированы от вируса ВБС с помощью методов твердофазного ИФА или ПЦР ОТ, однако они способны также опередить рост присутствующего вируса ВБС, что станет причиной ложноотрицательных результатов. Таким образом, при исследовании образцов экскрементов ПЦР ОТ является более чувствительным методом, чем выделение вируса.

**5.1 Приготовление образцов**

**5.1.1 Образцы пораженной ткани**

Образцы следует транспортировать в фосфатно-буферном солевом растворе (ФСБ) с антибиотиками, смешанном с глицерином (1/1), pH 7,2-7,6. Суспензия приготавливается путем перетирания образца в стерильном песке с помощью стерильных пестика и ступки с небольшим количеством ФСБ или среды, состоящей из культуры клеток ткани, и антибиотиков. После этого необходимо добавить среду, чтобы получилась приблизительно 10% суспензия. Суспензия очищается центрифугированием с центробежным ускорением 2000 g в течение 20-30 минут на высокой скорости центрифуги, после чего собирается надосадочная жидкость.

**5.1.2** **Образцы экскрементов**

Образцы экскрементов (приблизительно 20 г) ресуспендируются в минимальном количестве среды, состоящей из культуры клеток тканей, или в фосфатном буфере (0,04 моль фосфатного буфера или ФСБ). Суспензию гомогенизируют встряхиванием и осветляют центрифугированием при 2000 **g** в течение 20-30 мин; надосадочную жидкость собирают и фильтруют через фильтр 0,45 мкм.

**5.2 Выделение вируса**

Часть очищенной суспензии эпителиальной ткани или экскрементов, инокулируется на монослои клеток IB-RS-2 или других восприимчивых клеток тканей свиньи, выращенных в соответствующих контейнерах (сосуды/колбы с площадью поверхности 25 см2 , вращающиеся пробирки, 24-, 12- и 6-луночные планшеты). Для дифференцированной диагностики (например, ящура) в случае наличия поражений, имеющих клинические признаки, также должны использоваться системы клеточных культур тканей коровы. Как правило, вирус ВБС растет только в клетках тканей свиньи. В среду из культуры клеток ткани добавляется 10% бычьей сыворотки для роста клеток и 1–3% бычьей сыворотки для поддержания роста клеток, а также антибиотики

Культуры исследуются ежедневно. В случае обнаружения признаков цитопатического действия (ЦПД), собирается надосадочная жидкость, и идентификация вируса осуществляется методом твердофазного ИФА (или другим соответствующим методом, например, ПЦР ОТ). Отрицательные культуры подвергаются слепому пассажу через 48 или 72 часа и наблюдаются еще 2-3 дня. В случае отсутствия признаков ЦПД после второго пассажа, образец регистрируется с отметкой «ВНО» («Вирус не обнаружен»). При выделении вируса из экскрементов, в которых количество присутствующего вируса является низким, может потребоваться третий пассаж культуры клеток тканей.

**5.3 Иммунологические методы**

**5.3.1 Иммуноферментный анализ**

Сэндвич-метод непрямого твердофазного ИФА для обнаружения антигена вируса ВБС в качестве метода по выбору заменил реакцию связывания комплемента. Данный метод аналогичен методу, используемому для диагностики ящура. Лунки планшета для твердофазного ИФА покрыты кроличьей антисывороткой к вирусу ВБС. Это сывороткаловушка (захватывающая сыворотка). Добавляют суспензию испытуемого образца и инкубируют. Соответствующие контрольные образцы также включаются в исследование. Антисыворотка морской свинки к вирусу ВБС для обнаружения этого вируса добавляется на следующем этапе, после чего добавляется антисыворотка кролика к глобулину морской свинки, конъюгированная с пероксидазой хрена. В промежутках между всеми этапами осуществляется интенсивное промывание с целью удаления несвязанных реагентов. Положительная реакция определяется по возникновению цветной реакции на добавление хромогена (например, ортофенилендиамина) и субстрата (H2O2). Наличие сильных положительных реакций видно невооруженным глазом, однако результаты могут читаться также спектрофотометрическим способом на соответствующей длине волны; в данном случае показание оптической плотности ≥ 0,1 над фоном означает положительную реакцию. В качестве альтернативы антисывороткам морской свинки и кролика, могут использоваться подходящие моноклональные антитела (МА), нанесенные на лунки планшета для проведения твердофазного ИФА в качестве иммобилизованных антител или конъюгированные с пероксидазой и используемые в качестве идентифицирующих антител. Например, простой сэндвич-метод твердофазного ИФА, выполненный с использованием МА 5B7, выступающего как в качестве иммобилизованного антитела, так и в качестве конъюгированного/идентифицирующего антитела, представляющий собой также эталонный метод для серологического конкурентного твердофазного ИФА, подходит для обнаружения антигена вируса ВБС.

Твердофазный ИФА на основе МА также может использоваться для исследования антигенных вариаций среди штаммов вируса ВБС. Выращенные в культуре клеток тканей вирусные штаммы захватываются кроличьей гипериммунной антисывороткой к вирусу ВБС, адсорбированной до твердой фазы. После этого соответствующие наборы МА вступают в реакцию, и связывание МА с полевыми штаммами сравнивается со связыванием МА с родительскими штаммами. Сильное связывание свидетельствует о наличии эпитопов, распределенных между родительскими и полевыми штаммами.

**5.4 Методы распознавания нуклеиновой кислоты**

**5.4.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией**

Обратная транскриптаза с последующей ПЦР (ОТ-ПЦР) является полезным методом для обнаружения вирусного генома ВБС в различных образцах из клинических и субклинических случаев. Было описано несколько методов [3], применяя различные методы выделения РНК, нацеливаясь на различные части генома вируса ВБС и используя различные подходы для обнаружения продуктов амплификации ДНК. Однако в сравнительном исследовании положительных образцов фекалий из различных вспышек ВБС одноступенчатая ОТ-ПЦР [3] имела наилучшие диагностические характеристики, позволяя выявить все циркулирующие геномные суб-линии, по сравнению с двумя анализами ОТ-ПЦР в реальном времени, нацеленными на 5'-нетранслируемую область, и анализом изотермической амплификации, опосредованной петлей RT (LAMP).

Нижеописанный метод устанавливает правила иммуно-экстракции РНК и правила одноступенчатой ПЦР ОТ, мишенью которых является ген 3D вируса ВБС, кодирующий РНК-полимеразу.

Было показано, что для выделения РНК метод иммунозахвата с использованием специфических МА к вирусу ВБС особенно эффективен в случае образцов фекалий, он позволяет обогащать и очищать вирус ВБС, который обычно присутствует в низких концентрациях в фекалиях, с эффективным удалением потенциальных ингибиторов реакции.

Этот метод подходит для лабораторий, не имеющих сложного оборудования для обнаружения продуктов ДНК-амплификации в масштабе реального времени, однако в тех лабораториях, где такое оборудование имеется, может использоваться подход, который имеет ряд преимуществ, связанных с простотой использования и низким риском загрязнения продуктами ПЦР.

* + 1. **Иммуноэкстракция РНК**

a)Иммуноэкстракция РНК: покройте лунки планшета для проведения твердофазного ИФА насыщенным раствором МА 5B7 (200 мкл на лунку, разведенных в карбонатнобикарбонатном буфере) и осуществляйте инкубацию в течение ночи при температуре 4°C. Трижды промойте планшеты ФСБ. Используйте планшеты незамедлительно или храните их при температуре –20°C в течение срока, составляющего до 2­–3 недель, или в течение более длительного периода при условии стабилизации.

б) Распределите каждый образец (суспензию экскрементов) на три лунки планшета, покрытые 5B7 (200 мкл на лунку, всего 600 мкл образца).

в) После инкубации в течение 1 часа при температуре 37°C с очень медленным перемешиванием, трижды промойте лунки ФСБ. Промывка осуществляется вручную, во избежание перекрестного загрязнения между лунками.

г) Экстракция РНК производится из каждого образца, путем добавления лизирующего буфера, объемом приблизительно 100 мкл на лунку (4 моль гуанидин тиоцианата, 25 ммоль цитрата натрия, pH 7, 0,5% средства «Саркосил» (Sarkosyl)). Инкубируйте лунки в течение 3–5 минут и восстановите образец из трех лунок (всего 300–350 мкл), после чего перенесите материал в одну пробирку.

д) После этого осуществляется осаждение РНК путем добавления смеси из 750 мкл абсолютного этанола и 35 мкл 3 моль ацетата натрия (pH 5,2); содержимое лабораторных сосудов перемешивается вихревым способом и инкубируется при температуре минус 20°C в течение минимум 1 часа (также может потребоваться продленное осаждение в течение ночи при температуре –20°C).

е) Центрифугируйте образец с центробежным ускорением 15 500–16 000 g в течение 30 минут при температуре 4°C, после чего будет виден осадок, который необходимо промыть 500 мкл 70% холодного этанола (центрифугированного со скоростью 15,500-16,000 g в течение 10 минут при температуре 4°C) и высушить.

ж) Ресуспендируйте осадок РНК в 20 мкл диэтилпилокарбонатной воды или доступной в продаже воды, свободной от рибонуклеаз.

Примечание - В качестве альтернативы иммунозахвату, экстракция РНК может быть проведена с использованием подходящих коммерчески доступных наборов, основанных на хаотропном солевом лизисе и сродстве РНК к кремнезему

**5.4.2.1 Одноступенчатая ОТ-ПЦР**

Следующий протокол для обычной ОТ-ПЦР может потребовать корректировки в зависимости от используемых реагентов.

а) Составьте смесь для реакции (20 мкл – окончательный объем для каждого образца для испытаний).

Вода, свободная от рибонуклеаз 10.75 мкл

5×буфер ОТ ПЦР 5 мкл

Смесь дНТФ (10 ммоль каждого дНТФ) 1 мкл

Прямой праймер pSVDV-SS4 – 10 пкмоль/мкл\* 1 мкл

Обратный праймер pSVDV-SA2 – 10 пкмоль/мкл\* 1 мкл

Ингибитор рибонуклеазы 0,25 мкл

(эквивалент 5 ед)

Смесь ферментов для ОТ-ПЦР 1 мкл

Примечание - \*Последовательность праймеров: pSVDV-SS4 5'-TTC-AGA-ATG-ATT-GCA-TAT-GGG-G-3' pSVDV-SA2 5'-TCA-CGT-TTG-TCC-AGG-TTA-CY-3'

б) Добавьте 5 мкл каждой матричной РНК в 20 мкл реакционной смеси.

в) Выполните следующую процедуру в термоциклере:

Один цикл при температуре 50°C в течение 30 минут (этап обратной транскрипции)

Один цикл при температуре 95°C в течение 15 минут (этап начальной активации)

40 циклов при температуре 94°C в течение 20 секунд (этап денатурации), при температуре 60°C в течение 20 секунд (этап нормализации), при температуре 72°C в течение 45 секунд (этап элонгации)

Один цикл, при температуре 72°C в течение 10 минут (этап конечной элонгации).

г) Смешайте аликвоту 20 мкл каждого образца с 4 мкл наносимого красителя и нанесите на 2% агарозный гель, содержащий соответствующий интеркалирующий краситель ДНК. После завершения процедуры электрофореза, положительный результат определяется по наличию в геле фрагмента 154 bp гена полимеразы (3D) РНК ВВБС. В качестве альтернативы, гель может быть окрашен после процедуры электрофореза с целью снижения уровня загрязнения оборудования окрашивающим раствором.

* + - 1. **ОТ-ПЦР в реальном времени**

Этот тест также может быть адаптирован к формату ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием специальных реагентов/наборов, в присутствии подходящего красителя ДНК, с использованием следующей скорректированной программы в циклере ПЦР в реальном времени:

а) 1 цикл при температуре 50°C, в течение 30 минут (этап обратной транскрипции)

б) 1 цикл при температуре 95°C в течение 15 минут (начальный этап активации)

в) 40 циклов, каждый из которых состоит из 94°C в течение 15 секунд (денатурация), 58°C в течение 30 секунд (отжиг), 72°C в течение 30 секунд (удлинение), 77°C в течение 15 секунд (обнаружение).

Для цикла плавления:

г) 1 цикл при температуре 72°C в течение 1 минуты и повышении температуры с 72°C до 95°C с шагом 0,5°C в течение 5 секунд каждый. Специальные продукты усиления для ВБС генерируют кривые плавления с пиком в диапазоне температур 79,5-82,5°C.

**5.4.3 Секвенирование**

Сравнительный анализ последовательностей генома вируса является полезным при определении отношений между изолятами вируса ВБС. Посредством определения последовательностей гена 1D, кодирующего главный структурный белок VP1, или гена 3D стало возможным группировать штаммы вируса ВБС в соответствии с гомологией их последовательностей и устанавливать эпидемиологические связи между штаммами, вызывающими болезнь, в различных областях или в различные периоды времени (Brocchi *et al.*, 1997). База данных последовательностей гена *1D* и *3D* вирусов ВБС хранится в референтной лаборатории МЭБ, находящейся в г. Пирбрайт (Великобритания), и в референтной лаборатории МЭБ, находящейся в г. Брешиа (Италия), соответственно. Дополнительные секвенирования (в том числе для полных геномов вируса ВБС) доступны через Международную базу данных последовательностей нуклеотидов (включая GenBank, ENA и DDBJ).

**6 Серологические тесты**

Серологические тесты могут использоваться в качестве вспомогательных методов для подтверждения клинических случаев, а также для идентификации субклинических инфекций. Специфичное антитело к вирусу ВБС может быть идентифицировано с помощью метода микронейтрализации или твердофазного ИФА. Небольшая часть (до 0,1%) нормальных, неинфицированных свиней будет положительно реагировать при серологическом исследовании на ВБС. Реактивность этих одноэлементных реакторов является временной, так что их можно отличить от инфицированных свиней путем повторной выборки положительного животного и его когорт.

Диагностические и стандартные реагенты можно приобрести в референс-лабораториях.

**6.1 Нейтрализация вируса**

Количественный микроанализ методом НВ на наличие антител к вирусу ВБС выполняется с использованием клеток IB-RS-2 (или других подходящих восприимчивых клеток тканей свиньи) на плоскодонных микротитрационных планшетах для культур клеток тканей.

Вирус выращивается на монослоях клеток IB-RS-2 и хранится при температуре –20°C после добавления равного объема глицерина. Было обнаружено, что вирус ВБС сохраняет устойчивость в этих условиях как минимум в течение 1 года. Перед началом испытания, сыворотки инактивируются при температуре 56°C в течение 30 минут. Подходящей средой для данного исследования является полная среда Игла/LYH с антибиотиками.

Данное испытание представляет собой равнообъемный анализ с использованием сосудов объемом 50 мкл:

1. Начиная с разведения 1/4, сыворотки разводятся сериями двойных разведений на планшете, по два ряда лунок на одну сыворотку при объеме 50 мкл.
2. Добавляется предварительно титрированный вирус; каждая суспензия вируса объемом 50 мкл содержит около 100 полуинфицирующих доз культуры ткани (цитопатических доз 50% – ЦПД50).
3. Контроль включает в себя, как минимум слабоположительную и отрицательную сыворотки, контроль с клетками, контроль со средой и титрирование вируса, используемые для вычисления фактического титра вируса, применяемого в испытании.
4. Инкубируйте при температуре 37°C в течение 1 часа на накрытых планшетах.
5. Клеточная суспензия в пропорции 106 клеток/мл приготавливается в среде, содержащей 10% бычьей сыворотки, используемой для роста клеток. В каждую лунку добавляется по 50 мкл клеточной суспензии.
6. Планшеты запечатываются чувствительной к давлению лентой и инкубируются при 37°C в течение 2-3 дней. В качестве альтернативы, планшеты можно накрывать свободно надевающимися крышками и инкубировать в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при температуре 37°C в течение 2–3 дней.
7. Наблюдение под микроскопом целесообразно осуществлять спустя 48–72 часа; окончательную фиксацию и окраску планшетов можно выполнить на третий день. Фиксация осуществляется с помощью 10% раствора формалина/ соляного раствора в течение 30 минут; окрашивание проводят погружением в 0,05%-ный метиленовый синий в 10%-ном формалине на 30 минут. Планшеты промывают в водопроводной воде. Показателем положительного результата является окрашивание клеточных пластов в синий цвет (при котором вирус нейтрализован, а клетки остаются неповрежденными), в то время как пустые лунки (в которых вирус не был нейтрализован) являются показателем отрицательного результата.
8. Интерпретация результатов

Испытание считается действительным в том случае, когда количество вируса, фактически использованного на одну лунку находится между 101,5 и 102,5 ЦПД50, а положительные контрольные (стандартные) сыворотки находятся в пределах двойного значения ожидаемого для них титра. Титры выражаются в виде окончательных разведений сыворотки, содержащейся в смеси сыворотки/вируса, где 50% лунок защищены. Лаборатории должны сами устанавливать свои предельные титры, исходя из обоих результатов, полученных в отрицательной группе, и результатов, полученных с помощью контрольных реагентов, которые можно получить в референтных лабораториях МЭБ, в частности, низкоположительной сыворотки, определяющей самый низкий уровень антител, который лаборатория должна обязательно считать положительным.

* 1. **Иммуноферментный анализ**

Для обнаружения антител в образцах свиней имеются коммерческие наборы. В ИФА, разработанном Brocchi *et al.* (1995), вирусный антиген ВБС задерживается на твердой фазе с помощью МА 5B7. После этого оценивается способность тест-сывороток ингибировать связывание МА 5B7, конъюгированного с пероксидазой, с захваченным антигеном. Наконец, количество связанных конъюгированных МА определяется путем добавления субстрата и хромогена.

1. Планшеты для твердофазного ИФА покрываются МА 5B7 в объеме 50 мкл на лунку при насыщающем разведении в карбонатном/бикарбонатном буфере, pH 9,6, после чего в течение ночи осуществляется инкубация при температуре 4°C.
2. Планшеты трижды промываются ФСБ, содержащим 0,05% полисорбата Твин 20, после чего 50 мкл антигена вируса ВБС (вирус ВБС выращен в клетках IB-RS-2, очищен, отфильтрован и инактивирован с помощью бинарного этиленимина) при заранее определенном оптимальном разведении добавляется в каждую лунку. Оптимальное разведение антигена определяется путем титрирования методом «шахматной доски» антигена и конъюгированного МА, что позволяет определить рабочее разведение, дающее коэффициент поглощения верхней части линейной области кривой титрирования антигена (в промежутке между 1,5 и 2,0 единиц оптической плотности). После этого планшеты инкубируются в течение 1 часа при температуре 37°C.
3. После трех дополнительных промывок, 50 мкл тест-сыворотки (инактивация неуместна) и контрольная сыворотка инкубируются с захваченным антигеном в течение 1 часа при температуре 37°C. Сыворотки могут испытываться при однократном разведении (1/7,5) или титрироваться. В последнем случае, трехкратные разведения сывороток выполняются непосредственно в лунках для твердофазного ИФА путем добавления 10 мкл сыворотки в 65 мкл буфера (разведение 1/7,5), после чего 25 мкл переносится в последовательные лунки, содержащие 50 мкл буфера, перемешивается и, наконец, 25 мл выливается. При проведении предварительного испытания, разведение отбора 1/7,5 выполняется путем добавления 7 мкл каждой тест-сыворотки (и контрольных сывороток) в 45 мкл буфера, предварительно распределенного по лункам.
4. По завершении инкубации в течение 1 часа по 25 мкл оптимального разведения конъюгированного пероксидазой МА 5B7 (смотреть, пункт ii выше) добавляется в каждую лунку, после чего планшеты инкубируются при температуре 37°C в течение еще 1 часа.
5. После последней серии промывок, колориметрическая реакция развивается путем распределения 50 мл на лунку раствора субстрата (например, 0,5 мг/мл ортофенилендиамина в фосфатно-цитратном буфере, pH 5, содержащем 0,02% H2O2).
6. Реакция останавливается через 10 минут путем добавления 50 мкл 2N H2SO4. Показатели поглощения считываются на соответствующей длине волны с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Антиген, сыворотки и конъюгат разводятся в ФСБ, pH 7,4, содержащем 0,05% полисорбата Твин 20 и 1% дрожжевого экстракта; в качестве дополнительного компонента буфер для разведения сывороток содержит 1,0% мышиной сыворотки (или, в качестве альтернативы, другой источник мышиных иммуноглобулинов), что позволяет избежать неспецифичного связывания свиной сыворотки с МА 5B7, либо нанесенным на планшет, либо конъюгированным с пероксидазой.

1. Контрольные материалы*:* Четыре лунки на каждом планшете, содержащие все реагенты за исключением тест-сывороток, подтверждают максимальный уровень поглощения для антигена; отрицательная свиная сыворотка; низкоположительная контрольная (стандартная) свиная сыворотка; по желанию используется также сильноположительная свиная сыворотка в четырех разведениях, предварительно откалиброванная таким образом, чтобы показатель ингибирования составлял ≥50% (смотреть пункт viii ниже) при самом высоком значении разведения.
2. Интерпретация результатов: Реакции выражаются в виде процента ингибирования, характерного для тест-сыворотки реакции МА с антигеном вируса ВБС. Сыворотки считаются положительными, когда показатель ингибирования составляет ≥80% при разведении 1/7,5; сыворотки считаются отрицательными, когда показатель ингибирования составляет <70% при разведении 1/7,5; сыворотки считаются сомнительными, когда показатель ингибирования составляет ≥70% и <80% при разведении 1/7,5. Второе разведение (1/22,5) показывает количество антител: показатель ингибирования сильноположительных сывороток составляет >80% при разведениях 1/7,5 и 1/22,5, в то время как показатели ингибирования сывороток >80% при разведении 1/7,5, но <50% при разведении 1/22,5 считаются низкоположительными или пограничными. Все положительные, пограничные и сомнительные сыворотки должны быть подтверждены с помощью испытания методом НВ.

**7 Требования к вакцинам**

В настоящее время доступных вакцин против ВБС не существует.

**Библиография**

[1] «Об утверждении Ветеринарных (ветеринарно-санитарных) правил», утвержденные приказом Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 29 июня 2015 года № 7-1/587.

[2] Глава 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарных лабораториях и вивариях Руководства по наземным животным.

[3] Бенедетти Д., Пеццони Г., Грациоли С., Барбьери И. и Брокки Э. (2010). Сравнительная эффективность трех анализов амплификации генома для обнаружения вируса везикулярной болезни свиней в экспериментальных и полевых образцах. *В:* Материалах первого конгресса Европейской ассоциации ветеринарных лабораторных диагностов (EAVLD), Лелистад, Нидерланды, 15-17 сентября 2010 г., O-2-09.

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, везикулярная болезнь свиней, ветеринария, МЭБ, ВОЗЖ. |
|  |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, везикулярная болезнь свиней, ветеринария, МЭБ, ВОЗЖ. |
|  |

**РАЗРАБОТЧИК:**

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

|  |  |
| --- | --- |
| **Заместитель**  **Генерального директора** | **Е. Амирханова** |
| **Руководитель**  **Департамента разработки НТД** | **А. Сопбеков** |
| **Ведущий специалист**  **Департамента разработки НТД** | **Ж. Бейсен** |