Изображение государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**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** Республиканским государственным предприятием «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 от \_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ г. № \_\_\_\_

**3** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан «О ветеринарии» от 10 июля 2002 года N 339

**4** **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

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

**Содержание**

[1 Область применения 1](#_Toc138169940)

[2 Нормативные ссылки 1](#_Toc138169941)

[3 Обозначения и сокращения 1](#_Toc138169942)

[4 Методы диагностики 1](#_Toc138169943)

[5 Идентификация возбудителя 2](#_Toc138169944)

[5.1 Выделение вируса 2](#_Toc138169945)

[5.2 Обнаружение антигена методом иммунодиффузии в агаровом геле 3](#_Toc138169946)

[5.3. Методы обнаружения и характеристики нуклеиновых кислот 4](#_Toc138169947)

[5.4 Извлечение РНК из полевых образцов 5](#_Toc138169948)

[5.5 ОТ-ПЦР для диагностики чумы КРС на основе амплификации частей генов N и/или F 5](#_Toc138169949)

[5.6 ОТ-ПЦР в реальном времени для диагностики чумы КРС 6](#_Toc138169950)

[6 Серологические тесты 7](#_Toc138169951)

[6.1 Конкурентный иммуноферментный анализ 7](#_Toc138169952)

[6.2 Обнаружение антител методом иммунодиффузии в агаровом геле (AGID) 8](#_Toc138169953)

[6.3 Нейтрализация вируса 8](#_Toc138169954)

[7 Требования к вакцинам 9](#_Toc138169955)

[7.1 Характеристики посевного материала 9](#_Toc138169956)

[7.2 Метод производства 10](#_Toc138169957)

[7.3 Требования для получения регистрационного удостоверения 13](#_Toc138169958)

[7.4 Биотехнологические вакцины 14](#_Toc138169959)

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**Основные положения**

**Дата введения**

# **1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной диагностики чумы крупного рогатого скота (КРС).

# **2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте нормативные ссылки отсутствуют.

# **3 Обозначения и сокращения**

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения

+++ - рекомендуется;

++ - рекомендуется, но имеет ограничения;

+ - подходит в очень ограниченных случаях;

– - не соответствует;

AGID - иммунодиффузия в агаровом геле;

ОТ-ПЦР- полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой;

C-ИФА - конкурентный иммуноферментный анализ;

VN - нейтрализация вируса.

# **4 Методы диагностики**

**Таблица 1 – Методы диагностики чумы КРС и их назначение**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | Назначение | | | | | |
| Не зараженная популяция | Отсутствие заражения отдельных особей до перемещения | Участие в политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Распространенность инфекции – эпиднадзор | Иммунный статус у отдельных особей или популяций после вакцинации |
| Идентификация агента\* | | | | | | |
| Изоляция вируса | – | – | + | +++ | – | – |
| Обнаружение антигена (AGID) | – | – | + | + | + | – |
| (В реальном времени) ОТ-ПЦР | – | +++ | +++ | +++ | + | – |
| Выявление иммунного ответа | | | | | | |
| AGID | + | + | + | – | + | + |
| C-ИФА | ++ | – | ++ | – | ++ | ++ |
| VN | +++ | – | +++ | – | +++ | +++ |
| \* Рекомендуется сочетание методов идентификации агентов, применяемых на одном и том же клиническом образце | | | | | | |

# **5 Идентификация возбудителя**

## **5.1 Выделение вируса**

Вирус чумы КРС можно культивировать из лейкоцитарной фракции цельной крови, собранной в гепарин или ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота) при конечной концентрации 10 международных единиц (МЕ)/мл и 0,5 мг/мл соответственно. Образцы следует тщательно перемешать и перенести в лабораторию на льду, но ни в коем случае не замораживать. В среднем, начало виремии немного предшествует началу пирексии и может продолжаться в течение 1-2 дней после того, как пирексия начинает ослабевать. Следовательно, животные, у которых наблюдается пирексия, вероятно, являются виремичными и поэтому являются лучшим источником крови, из которой можно попытаться выделить вирус. Однако, поскольку иногда лихорадящие животные могут уже не быть виремичными, для представления следует собрать образцы от нескольких лихорадящих животных. Вирус также может быть выделен из образцов миндалин, селезенки, прескапулярных или брыжеечных лимфатических узлов мертвых животных; эти образцы могут быть заморожены для транспортировки. Транспортировка должна осуществляться в условиях биологической безопасности в соответствии с правилами международной перевозки, описанными в Главе 1.1.2 Сбор, представление и хранение диагностических образцов, Главе 1.1.3 Транспортировка биологических материалов и в Руководстве по секвестрации вируса чумы крупного рогатого скота.

Для выделения вируса из крови, некоагулированную кровь центрифугируют при 2 500 g в течение 15 минут до образования слоя лейкоцитарной пленки между слоями плазмы и эритроцитов. Пленку отделяют настолько чисто, насколько это возможно, смешивают с 20 мл физиологического раствора и снова центрифугируют в качестве отмывки для удаления любых нейтрализующих антител, присутствующих в плазме. Получившийся клеточный осадок суспендируют в поддерживающей среде для культур клеток и аликвотами и по 2 мл наносят на монослои первичных клеток почки теленка, лимфобластоидов мартышки B95a, бычьих Т-лимфобластов, трансформированных тейлерией, или клеток почек африканской зеленой мартышки (Vero), предпочтительно клеток Vero, экспрессирующих морбилливирусный рецептор SLAM. Эти клетки можно культивировать в роллерных пробирках, колбах для культур или многолуночных планшетах.

В качестве альтернативы можно использовать 20%-ную суспензию (в/в) посмертной ткани. Это должно быть сделано путем мацерации твердых тканей в бессывороточной среде для поддержания культуры с использованием стандартных методов измельчения или сдвига и инокуляции монослоев, как и ранее. Освобождение вируса из твердой ткани может быть достигнуто несколькими способами. Самый простой – с использованием пестика и ступки, хотя для этой процедуры в качестве абразивного материала нужен стерильный песок. Также ткани можно размолоть без абразива, используя цельностеклянный гомогенизатор, например, гомогенизатор Ten Broeck. Методы измельчения в равной степени применимы и при использовании блендеров. Суспензии, содержащие вирусы, осветляются путем низкоскоростного центрифугирования. Объем посевного материала не имеет критического значения; рабочий объем составляет от 1 до 2 мл. Обычно используются антибиотики: пенициллин и стрептомицин в комбинации, каждый в концентрации 100 МЕ/мл или 100 мкг/мл. Аналогичное покрытие широкого спектра действия может быть получено при использовании неомицина в концентрации 50 мкл/мл. Амфотерицин В следует вводить в дозе 2,5 мкг/мл.

Инокулят следует удалить через 1-2 часа и заменить свежей средой. Культуральную поддерживающую среду сливают и заменяют каждые 2-3 дня, монослои исследуют под микроскопом на предмет развития цитопатогенного эффекта (ЦПЭ). Цитопатогенный эффект характеризуется преломлением, округлением клеток, ретракцией клеток с вытянутыми цитоплазматическими мостиками (звездчатые клетки) и/или образованием синцитий. Скорость развития цитопатогенного эффекта варьирует в зависимости от субстрата и, вероятно, также от штамма вируса. В первичных клетках это занимает до 12 дней, в клетках Vero – неделю, а в клетках В95а – 2-4 дня. До объявления важных образцов отрицательными возможно проведение слепых пассажей. Изоляты вируса могут быть частично идентифицированы путем демонстрации специфических для морбилливируса преципитиногенов в остатках инфицированных клеток, или полностью идентифицированы путем ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных для вируса чумы КРС (смотреть ниже) или демонстрации специфической иммунофлюоресценции с использованием моноклонального антитела, специфичного для вируса КРС.

## **5.2 Обнаружение антигена методом иммунодиффузии в агаровом геле**

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

С помощью пипетки малого объема в центральную лунку помещают гипериммунную в отношении чумы КРС кроличью сыворотку. При отсутствии положительного контроля, содержащего чуму крупного рогатого скота, в качестве контроля можно использовать ВЧМЖ (например, препараты вакцинного вируса), которые следует помещать в чередующиеся периферийные лунки (т.е. в первую, третью и пятую). Отрицательный контрольный антиген помещают в лунку 4. Тестируемые антигены представляют собой экссудаты с поверхности среза селезенки или лимфоузла, представленных для тестирования; если экссудат получить невозможно, небольшую часть образца размалывают с минимальным количеством солевого раствора. Выделения из глаз можно выжать непосредственно из тампонов или путем отжима в микропипетке (ватную часть тампона отрезают и помещают в широкий конец пластикового наконечника для пипетки объемом 50-250 мкл и с помощью стержня тампона небольшой объем экссудата выдавливают из узкого конца наконечника). Тестовые образцы добавляются во вторую и шестую лунки. Реакцию лучше всего проводить при 4ºC или при низкой температуре окружающей среды. Зону реакции следует осматривать начиная с 2 часов на предмет появления чистых, четких полос осаждения между лунками, образующих линию, идентичную контрольной. Тесты следует отбраковывать через 24 часа, если результат не был получен. Результат неприемлем, за исключением случаев, когда реакции преципитации дают полосу идентичности с контрольным препаратом положительного антигена.

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

## **5.3. Методы обнаружения и характеристики нуклеиновых кислот**

Для специфической диагностики вируса чумы КРС были разработаны методы ОТ-ПЦР, основанные на амплификации частей генов белков N или F (Forsyth & Barrett, 1995). Этот метод чрезвычайно чувствителен, специфичен и может выявлять вирус чумы КРС у крупного рогатого скота уже через два дня после заражения, а его преимущество заключается в том, что результаты получаются через 5 часов, включая выделение РНК. Ниже подробно описаны два наиболее часто используемых протокола. Продукты ПЦР анализируют на 1,5%-ном (по массе) агарозном геле вместе с подходящим ДНК-маркером для идентификации конкретного ДНК-продукта.

Анализ ОТ-ПЦР в реальном времени для диагностики вируса чумы КРС был описан Carrillo et al. (2010). Этот анализ показал свою чувствительность, выявление изолятов, представляющих все известные филогенетические линии вируса, и четкую дифференциацию вируса чумы КРС от ВЧМЖ и других клинически сходных заболеваний (вирус ящура, вирус бычьей вирусной диареи, вирус бычьего герпеса, вирус везикулярного стоматита). Сравнение образцов, полученных от экспериментально зараженных животных, показало, что лейкоциты и конъюнктивальные мазки являются образцами выбора для этого теста, позволяя доклинически выявить заболевание на 2-4 день после заражения. В случае вспышки КРС, этот метод ОТ-ПЦР в реальном времени в формате одной пробирки позволяет проводить доклиническую диагностику, тем самым помогая предотвратить дальнейшую передачу заболевания. Однако следует отметить, что этот анализ был разработан после последнего случая чумы у КРС и никогда не использовался на практике для диагностики чумы у КРС. Лабораториям, кроме референс-лабораторий МЭБ, которые желают провести собственное тестирование подозрительных случаев, рекомендуется проводить ОТ-ПЦР на основе геля с использованием доступных контролей.

Для методов ПЦР в геле и в реальном времени необходимо включить положительный контроль, такой как ВЧМЖ (со специфическими праймерами) или бычий актин, а также отрицательный контроль с использованием стерильной дистиллированной воды вместо РНК. Положительные реакции с набором праймеров, специфичных для чумы КРС, должны быть подтверждены либо с помощью дополнительных наборов праймеров, специфичных для чумы у КРС, либо путем анализа последовательности ДНК-продукта.

## **5.4 Извлечение РНК из полевых образцов**

Вирусная РНК может быть очищена из лимфатического узла или миндалины (идеально), лимфоцитов периферической крови (ЛПК), мазков из глаз или поражений ротовой полости, или из селезенки (не идеально из-за высокого содержания крови). Образцы тканей должны быть экстрагированы подкисленным гуанидин-тиоцианатом фенола (Forsyth & Barrett, 1995) с использованием одного из имеющихся коммерческих препаратов. Твердые ткани (0,5– 1,0 г) измельчают и гомогенизируют с 10 мл реагента, мазки из глаз и полости рта -1,0 мл и очищенные лимфоциты периферической крови (из 5 мл цельной крови) гомогенизируют с 1,0 мл; затем РНК очищают в соответствии с процедурой производителя. Для лимфоцитов периферической крови или мазков также подходят спин-колонки для экстракции РНК. Полученную РНК хранят при температуре -70°C или -20°C до тех пор, пока она не понадобится.

Синтез кДНК и ПЦР осуществляются с помощью комбинированной реакции в одной пробирке. Подходящие реагенты можно приобрести у ряда производителей в дополнение к тем, что приведены в примере протокола. Продукты ПЦР анализируют на 1,5% (масса/объем) агарозном геле вместе с подходящим маркером ДНК для идентификации конкретных продуктов ДНК. Для проверки этапа выделения РНК и реагентов для ОТ-ПЦР следует включить внутренний положительный контроль, например, праймеры для бета-актина; по возможности следует провести параллельное выделение ВЧМЖ и идентифицировать вирусную РНК с помощью праймеров, специфичных для ВЧМЖ (глава 3.8.9, раздел 2.4). В каждый набор реакций должен быть включен отрицательный контроль с использованием стерильной дистиллированной воды вместо РНК. Положительные реакции с любым из наборов праймеров, специфичных для чумы КРС, должны быть подтверждены анализом последовательности ДНК-продукта. Кроме того, положительные образцы должны быть направлены в референс-лабораторию МЭБ в Соединенном Королевстве (Великобритания) для проведения подтверждающего тестирования. Важно использовать более одного набора праймеров для этапа ПЦР при тестировании на присутствие РНК-вирусов, поскольку их нуклеотидные последовательности могут значительно отличаться, и несоответствие праймера на 3'-конце или внутри последовательности праймера может привести к тому, что праймеры не смогут амплифицировать ДНК. Всемирная референтная лаборатория3 ФАО в Великобритании, которая также является референтной лабораторией МЭБ по чуме крупного рогатого скота, и референтная лаборатория МЭБ во Франции4), могут дать рекомендации по использованию этого метода для анализа полевых образцов.

## **5.5 ОТ-ПЦР для диагностики чумы КРС на основе амплификации частей генов N и/или F**

Амплификация генов N и F основана на первоначальном протоколе, описанном Forsyth и Barrett (1995), переформулированном в одноэтапный метод ОТ-ПЦР. Для описанного теста требуются следующие материалы: коммерческий набор для одноэтапной ОТ-ПЦР, дистиллированная вода и праймеры, а также подходящая машина для ПЦР. Также необходимо оборудование для электрофореза ДНК в агарозе.

Последовательности используемых праймеров:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ген | Крупность | Праймер | Последовательность (5’ → 3’) |
| чума КРС N | 297 bp | B2 | ATC-CTT-GTC-GTT-RTA-TGC-TCT-YRG |
| B12 | CAA-GGG-RRT-GAG-ACC-CAG-MAC-AR |
| чума КРС F | 448bp | F3B | AGT-ATA-АГА-GGC-TGT-TGG-GGA-CAG-T |
| F4D | TGG-GTC-TCT-GAG-GCT-GGG-TCC-AAA-T |
| β-актин | 275bp | BA1 | GAG-AAG-CTG-TGC-TAC-GTC-GC |
| BA2 | CCA-GAC-AGC-ACT-GTG-TTG-GC |

Приготовить каждое разбавление праймера, добавив 5 мкл исходного раствора праймера (100 Мкм) к 45 мкл дистиллированной воды. Получается концентрация праймер 10 мкм при конечном объеме 50 мкл.

Для каждого исследуемого гена, приготовить мастер-смесь для ПЦР, содержащую 0,6 мкМ конечной концентрации праймеров.

Добавить 5 мкл РНК-матрицы к 45 мкл каждой основной смеси. Вместо РНК добавить дистиллированную воду (5 мкл) для получения отрицательного контроля, который должен быть включен в каждый набор тестов.

Условия термоциклера следующие:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 50°C в течение 30 минут | 1 цикл | Этап обратной транскрипции |
| 95°C в течение 15 минут | 1 цикл | Инактивирует RT и активирует полимеразу |
| 94°C в течение 30 секунд |  |  |
| 55°C в течение 30 секунд | 40 циклов | ПЦР-амплификация кДНК |
| 72°C в течение 1 минуты |  |  |
| 72°C в течение 5 минут | 1 цикл | Окончательное расширение |
| 4°C (неопределенно) | – | – |

Десять микролитров каждой реакции анализируют электрофорезом на 1,5% агарозном геле. При всех положительных результатах, остаток конечного продукта может быть непосредственно использован для секвенирования.

## **5.6 ОТ-ПЦР в реальном времени для диагностики чумы КРС**

Анализ ОТ-ПЦР в реальном времени проводится в основном так, как описан Carrillo et al., 2010. Как правило, реакция проводится в объеме 20 мкл. Существует несколько подходящих реагентов для одно этапного ОТ-ПЦР, и точные условия реакции должны быть изменены в соответствии с реагентами и используемой машиной для ПЦР в реальном времени. За подробной консультацией по этому тесту обращайтесь в референс-лаборатории МЭБ.

# **6 Серологические тесты**

# **6.1 Конкурентный иммуноферментный анализ**

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

Антиген вируса чумы КРС получают из культур клеток почек теленка Madin-Darby, инфицированных аттенуированным штаммом Kabete «О» вируса чумы КРС и инактивированных нагреванием до 56ºC в течение 2 часов. Антиген вируса экстрагируют из инфицированных клеток посредством многократных циклов обработки ультразвуком и центрифугирования. Моноклональные антитела получают посредством слияния спленоцитов гипериммунизированных мышей с линией клеток миеломы NSO с последующей демонстрацией их специфичности для белка H вируса чумы КРС; в настоящее время эти моноклональные антитела обозначают как С1. Наборы по-прежнему будут доступны в продаже.

Процедура теста:

i) Лиофилизированный антиген вируса чумы КРС восстанавливают с помощью 1 мл стерильной воды и разводят до рекомендованного производителем рабочего разведения, используя 0,01 М фосфатнобуферный раствор, рН 7,4.

ii) Сразу после этого разведенный антиген в объемах по 50 мкл распределяют по соответствующему количеству лунок на плоскодонном микропланшете для ИФА, обеспечивающем высокий уровень связывания белка, выделяя по две лунки для каждой исследуемой сыворотки. Чтобы равномерно распределить антиген по дну каждой лунки, нужно слегка постучать по бокам микропланшета, затем запечатать его и инкубировать на шейкере с орбитальным вращением в течение 1 часа при 37ºC. Лунки промывают три раза 0,002 М фосфатно-буферным раствором, pH 7,4.

iii) В каждую тест-лунку вносят 40 мкл блокирующего буфера (0,01 М ФБР, 0,1% (в объемном отношении) Тween 20 и 0,3% (в объемном отношении) нормальной бычьей сыворотки), а затем вносят все исследуемые сыворотки в объемах по 10 мкл.

iv) Рабочее разведение моноклонального антитела в блокирующем буфере готовят в соответствии с рекомендациями производителя и вносят по 50 мкл разведенного моноклонального антитела в каждую тест-лунку. Планшеты запечатывают и снова инкубируют на шейкере с орбитальным вращением в течение 1 часа при 37ºC.

v) Следуйте рекомендациям производителя, чтобы приготовить рабочее разведение конъюгата пероксидазы кроличьего иммуноглобулина против мыши с хреном в блокирующем буфере и добавить по 50 мкл в каждую тестируемую лунку. Планшеты запечатывают и снова инкубируют на шейкере с орбитальным вращением в течение 1 часа при 37ºC.

vi) В конце этого этапа планшеты промывают, как указано выше, и сразу снова наполняют смесью субстрата и хромогена в объемах по 50 мкл (1 часть 3% Н2О2 к 250 частям орто-фенилендиамина) и инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут без встряхивания. Затем вносят 50 мкл стоп-раствора, состоящего из 1 М серной кислоты.

vii) Данная тест-система должна включать положительные и отрицательные сыворотки, контроль для моноклонального антитела и контроль для конъюгата.

viii) Полученные показатели оптической плотности измеряют на ИФА-ридере с интерференционным фильтром 492 нм и переводят в значения процента ингибирования в сравнении со значением, полученным при использовании контроля для моноклонального антитела. Значения процента ингибирования 50% и более указывают на положительный результат теста, значения ниже 50% - на отрицательный.

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

## **6.2 Обнаружение антител методом иммунодиффузии в агаровом геле (AGID)**

Тест AGID может использоваться для скрининга сывороток крупного рогатого скота при подозрении на заболевание чумой крупного рогатого скота, где ВЧМЖ не циркулирует. Как отмечалось в разделе 1.2, тест не различает ВЧМЖ и чуму КРС, поэтому антитела к любому из этих вирусов дадут положительную реакцию. Установите AGID, как описано в пункте 1.2, за исключением того, что центральная лунка содержит суспензию вакцины ВЧМЖ, а внешние лунки содержат известные антисыворотки против чумы КРС (позиции 1, 3 и 5), отрицательную контрольную сыворотку (например, коммерческую бычью сыворотку) в позиции 4 и тестовые сыворотки в позициях 2 и 6. Антитела к чуме КРС вступают в перекрестную реакцию с антигенами ВЧМЖ, приводя к образованию линий преципитина.

## **6.3 Нейтрализация вируса**

Тест на нейтрализацию вируса (VNT) проводится в роллерных пробирках или культуральных колбах первичных клеток почек телят по методу Plowright & Ferris (1961) или в 96-луночных микропланшетах (Taylor & Rowe, 1984); оба теста были подтверждены на экспериментально зараженном крупном рогатом скоте.

В ходе процедуры, осуществляемой в роллерных пробирках, неинактивированные нагреванием сыворотки разводят в интервалах от 1 до 10, затем, начиная с неразведенной сыворотки, смешивают с равным объемом 103.0 ТЦД50 на мл аттенуированного вакцинного штамма вируса. Смеси инкубируют в течение ночи при 4ºC, затем в каждую из пяти роллерных пробирок вносят по 0,2 мл, с последующим немедленным введением 1 мл диспергированных индикаторных клеток, суспендированных в ростовой среде в соотношении 2×105 клеток/мл. Пробирки инкубируют при 37ºC в течение первых трех дней, затем повторно наполняют поддерживающей средой и помещают в роллер. Пробирки регулярно исследуют на наличие вирусспецифического цитопатогенного действия, положительные пробирки учитывают и убирают; окончательный учет результатов проводят на 10 день. Для подсчета конечных показателей доза вируса считается достаточной, если конечное разведение находится в диапазоне от 101.8 до 102.8 ТЦД50/пробирку. В данных обстоятельствах считается, что присутствие любого количества обнаруживаемых антител в ½ конечного разведения сыворотки указывает на перенесенную инфекцию вирусом чумы КРС.

При микропланшетном методе, сыворотки перед использованием подвергаются тепловой инактивации в течение 30 минут при температуре 56˚C. Для этого теста, первоначальное разведение сыворотки (1/5) дополнительно разводят с двукратными интервалами. Затем сыворотку в объемах по 50 мкл инкубируют с вирусом в объемах по 50 мкл, разведенным таким образом, чтобы ТЦД50 разведения составлял от 101.8 до 102.8 (Taylor & Rowe, 1984). После инкубации от 45 минут до ночи, в качестве индикаторов добавляют 50 мкл чувствительных к чуме КРС клеток (от 1 до 2 × 105 первичных клеток почки теленка или ягненка, 5 × 103 клеток Vero или Vero-SLAM или 5 × 104 клеток B95a). Реакцию останавливают через 6-7 дней. Такие тесты могут свидетельствовать о неспецифической нейтрализации при высоких концентрациях в сыворотке крови. По-видимому, в некоторых сыворотках от здоровых животных (без перенесенной инфекции чумы КРС) могут присутствовать факторы, которые обуславливают неспособность вируса проникать и реплицироваться в индикаторных клетках. В ходе реакции в пробирках влияние данных факторов, вероятно, нивелируется во время смены поддерживающей среды; при проведении теста на микропланшетах данные факторы присутствуют в течение всего периода исследования. Если наивысшая концентрация конечного разведения сыворотки не превышает 1/10, то данный эффект исчезает.

Следует отметить, что, поскольку этот тест требует манипуляций с живым вакцинным вирусом, в настоящее время VNT может проводиться только в утвержденных ФАО-МЭБ учреждениях по борьбе с чумой крупного рогатого скота, имеющих специальное разрешение на проведение данной процедуры.

# **7 Требования к вакцинам**

## **7.1 Характеристики посевного материала**

7.1.1 Биологические характеристики

i) Вакцина Plowright (RBOK)

Вакцинный штамм был получен путем 90 пассажей в первичных клетках почки теленка, и было показано, что он безопасен, эффективен и устойчив к реверсии к вирулентности в течение 7 обратных пассажей у крупного рогатого скота (Plowright, 1962). Последовательность вакцины была опубликована (Baron & Barrett, 1995) и размещена в общедоступных базах данных. Партии посевного материала, используемые для производства Plowright TCRV (культуры клеток ткани противочумной вакцины), должны производить клеточно-культуральную вакцину, которая является такой же безопасной и обеспечивает иммунитет у крупного рогатого скота продолжительностью не менее 5 лет. Иммуногенность посевного материала продемонстрирована вплоть до 122-го пассажа в клетках почки теленка, дальнейшее пассирование не рекомендуется. Поддержание вакцинного штамма осуществляется в системах посевного материала между пассажами 90-го и 120-го уровня. Посевной вирус хранят в сублимированном состоянии при температуре -20°C или ниже. Вирус культивируют в клетках Vero или в первичных, или серийно культивированных клетках почки, полученных от здорового плода теленка или очень молодого теленка. Серийно культивированные клетки должны быть получены не позднее, чем после десяти пассажей исходной культуры.

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

ii) Вакцина LA-AKO

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

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

7.1.2. Критерии качества

i) Особые примечания

В связи с тем, что чума у КРС была искоренена во всем мире, необходимо уделить особое внимание инокуляции животных для оценки безопасности и эффективности. Рекомендуется секвенировать вакцинный вирус-кандидат и сравнить его с эталонными штаммами вируса чумы, чтобы оценить сходство, которое сводит на нет необходимость инокуляции животных.

Необходимо подтвердить, что посевной материал как Plowright и LA-AKO является:

a) Чистым

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

b) Безопасным

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

c) Эффективным

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

## **7.2 Метод производства**

7.2.1 Процедура

Отдельные партии вакцин готовятся путем заражения клеточных культур и, после соответствующего инкубационного периода, сбора либо вышележащей среды, либо среды и инфицированных клеток вместе. Вирус должен быть собран из культур не более чем через 7 дней (LA-AKO) или 10 дней (Plowright) после даты заражения этих культур. Решение о сборе среды должно основываться на развитии обширных характерных ЦПЭ в монослое клеток.

Чтобы составить партию, инфицированные культуры должны быть инокулированы одним и тем же посевным вирусом, инкубированы и собраны вместе.

Для образования объемной суспензии перед смешиванием с криопротектором среду следует осветлить низкоскоростным центрифугированием или фильтрацией.

Допускается получение нескольких сборов из одного и того же набора культур, которые могут быть объединены для получения одной объемной суспензии. Для длительного хранения и распространения в холодовой цепи, объемные суспензии подвергают лиофилизации.

Письменные записи должны сопровождать все этапы производства вакцины.

7.2.2 Требования к субстратам и средам

i) Клетки

Вакцина Plowright может быть выращена в первичных клетках почек эмбрионов крупного рогатого скота или телят, или в клетках, полученных в результате серийных пересевов в количестве до десяти из любого из этих источников. Кроме того, вакцина может быть изготовлена из одобренных непрерывных клеточных линий; Для этой цели использовались клетки Vero. Основной посевной материал LA-AKO обычно готовят из куриных яиц с эмбрионами SPF. Клетки Vero используются для производства рабочих/производственных посевных материалов или вакцины LA-AKO. Во всех случаях должно быть доказано, что клетки не заражены адвентивными вирусами, включая вирус бычьей вирусной диареи (BVDV), вирус бычьей лейкемии (BLV), ротавирус крупного рогатого скота и вирус блютанга (BTV), и должны поддерживаться в системе партии посевного материала.

ii) Среда

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

Клетки Vero выращивают в минимальной эссенциальной среде Игла с добавлением 10% термообработанной фетальной телячьей сыворотки и 0,295% триптозофосфатного бульона (TPB) с антибиотиками по мере необходимости. Использовались и другие составы среды, например, среда Глазго, модифицированная среда Игла (GMEM), дополненная 14% (об/об) TPB и 6% (об/об) бычьей сыворотки, не подвергнутой тепловой обработке (не содержащей антитела чумы крупного рогатого скота), с антибиотиками по мере необходимости. Вся сыворотка должна быть получена от животных, восприимчивых к чуме крупного рогатого скота, и происходить из стран с незначительным риском губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота.

iii) Криопротектор

Для лиофилизации, объемную суспензию вируса смешивают с равным объемом раствора, содержащего либо 5 % гидролизата лактальбумина и 10 % сахарозы, либо 1 % глутамата натрия, 0,3 % поливинилпирролидона и 10 % сахарозы.

7.2.3 Контроль в процессе производства

Чтобы гарантировать свойства эталонного посевного материала, по возможности следует провести маркерный тест. Титрование вируса необходимо проводить для каждой партии нерасфасованной суспензии и самой конечной нерасфасованной суспензии с использованием десятикратных разведений вируса в системе микропланшетов или роликовых пробирок и с использованием от четырех до десяти повторов на разведение. Каждая партия окончательной нерасфасованной суспензии или сама окончательная нерасфасованная суспензия также должна быть проверена на случайную вирусную контаминацию с помощью соответствующих анализов, включая один или несколько из следующих:

i) Образцы смешивают с нейтрализующим титром кроличьей антисыворотки против чумы крупного рогатого скота, добавляют к непрерывным культурам клеток Vero, клеток бычьих почек или яичек и инкубируют при 37°С в течение 7 дней. В течение инкубационного периода в этих клетках не должно развиваться никаких ЦПЭ.

ii) Образцы инокулируют на линию эмбриональных клеток почки африканских обезьян, MA-104, которая, как сообщается, очень чувствительна к обезьяньему ротавирусу (Smith et al., 1979). У инокулированных клеток MA-104 не должно развиться ЦПЭ.

iii) 10 мл образца из партии суспензии осветленного сбора или нерасфасованной суспензии смешивают с нейтрализующим титром кроличьей антисыворотки против чумы крупного рогатого скота и внутримышечно инокулируют овцам, чувствительным к вирусу лейкемии крупного рогатого скота (BLV). Сыворотку, полученную от овец через 2 и 3 мес после прививки, следует исследовать на наличие антител к BLV методом иммунодиффузии в агарозном геле.

Партия осветленного сбора или нерасфасованная суспензия, также может быть подвергнута маркерному тесту, если таковой имеется. Вакцина LA-AKO вызывает заметное увеличение размеров селезенки у инокулированных куриных эмбрионов. 15 мкл десятикратного и стократного разведения образца готовой промышленной суспензии вводят в кровяной сосуд более 10 куриных яиц на 11 или 12 день кладки. Инокулированные яйца инкубируют при температуре 38ºC в течение 5 дней. Селезенки куриных эмбрионов, оставшихся живыми после заражения, собирают и взвешивают. Селезенки должны стать тяжелее на 15 мг.

Проверки на случайную вирусную контаминацию следует проводить, по крайней мере, на двух неинфицированных контрольных клеточных культурах, приготовленных из клеточной суспензии, используемой в серийном производстве после того, как они были выдержаны с использованием тех же сред и условий инкубации, что и клетки, инфицированные чумой крупного рогатого скота. Они должны подвергаться частым микроскопическим наблюдениям в процессе работы с отрицательными результатами. После сбора вируса, контрольные культуры должны быть промыты для удаления бычьей сыворотки и повторно инкубированы в течение 10 дней в среде, содержащей заменители бычьей сыворотки, в течение этого периода они снова подвергаются частым микроскопическим наблюдениям для выявления признаков цитопатических изменений. В конце этого периода, по крайней мере одна культура должна быть исследована на наличие нецитопатического вируса BVD с помощью иммунофлуоресцентного или иммунопероксидазного теста или ОТ-ПЦР.

Контрольные культуры также могут быть исследованы на гемадсорбционную активность. Неинфицированные культуры должны быть промыты для удаления бычьей сыворотки и разделены на две группы. Каждую группу покрывают 0,1% суспензией эритроцитов морских свинок или гусей на 1 час, затем просматривают под микроскопом. В контрольных культурах не должно наблюдаться абсорбции эритроцитов этих видов.

До лиофилизации, партию осветленного сбора или объемной суспензии можно выдерживать не более 5 сут при 4°С, но значительно более длительное хранение возможно при замораживании при температуре от -20°С до -80°С.

7.2.4 Испытания серии готового продукта

i) Стерильность и чистота

Тесты на стерильность и отсутствие загрязнения биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования, приведены в главе 1.1.9.

Конечный продукт партии состоит из лиофилизированных флаконов, изготовленных из одной нерасфасованной суспензии; партия может содержать несколько партий наполнения. Содержимое одного контейнера из каждой расфасованной партии нейтрализуют с использованием кроличьей антисыворотки против чумы КРС, используя метод изменяющегося вируса/постоянной сыворотки, и инокулировали в первичные бычьи почки или другие восприимчивые клетки. Идентичность продукта устанавливается, если не развивается ЦПЭ, специфичный для чумы крупного рогатого скота.

ii) Безопасность и эффективность

Процедуры могут иметь незначительные различия в зависимости от страны и системы производства. Для созданных посевных материалов вируса, тестирование безопасности и эффективности на животных может быть сочтено ненужным.

Животные, используемые в этих процедурах, должны содержаться в изоляции от других восприимчивых к чуме животных. По окончании процедур, они должны быть убиты, а туши надежно утилизированы. При использовании восприимчивого к чуме крупного рогатого скота содержимое от одного до пяти случайно выбранных флаконов объединяют и используют для прививки каждого из двух или трех голов крупного рогатого скота объемом, эквивалентным однократной полевой дозе крупного рогатого скота (где полевая доза принимается равной ≥ 1000 ТЦД50). Кроме того, одна крупная особь может быть инокулирована объемом, эквивалентным 100 полевым дозам КРС. Эти животные содержатся в биологически безопасном помещении для животных, в течение последующих 2-3 недель. В этот период животных подвергают ежедневной регистрации температуры и частым клиническим осмотрам. В конце этого периода скот обследуют на наличие сывороточных антител, нейтрализующих чуму крупного рогатого скота (раздел Б.2.2). Вакцина считается безопасной и эффективной, если она не вызывает никаких аномальных клинических реакций, кроме легкой гипертермии, и если у всех вакцинированных животных титр нейтрализации чумы КРС составляет 1/10 или выше.

В общих чертах, безопасность вакцины Plowright была широко продемонстрирована как на европейских, так и на индийских породах крупного рогатого скота, а также на карликовых западноафриканских породах. Она не была протестирована на японских или китайских породах, и ее безопасность для таких животных не может быть гарантирована. Вакцина LA-AKO была протестирована на безопасность на высоковосприимчивой породе, японской черной, а также на голштинской породе.

iii) Иммуногенность серии

Тесная взаимосвязь между иммунизирующей активностью и инфекционностью позволяет использовать последнюю в качестве основы для оценки эффективности. Титрование инфекционности проводят с использованием клеток утвержденной непрерывной линии или клеток, выращенных из каждой из трех различных почек телят или эмбрионов крупного рогатого скота. Количество оценок титра вируса и количество флаконов, объединенных для каждой оценки, следует определять в зависимости от размера партии и локальной воспроизводимости анализа. Чувствительность клеток, используемых на каждом этапе работы, определяют с помощью стандартного лабораторного препарата вируса чумы КРС. Конечный титр представляет собой геометрическое среднее значение всех оценок, каждая из которых произведена с использованием десятикратных разведений и десяти наблюдений на одно разведение. Сильнодействующая вакцина должна содержать ≥ 100 полевых доз во флаконе.

## **7.3 Требования для получения регистрационного удостоверения**

**7.3.1** **Требования к безопасности**

i) Безопасность целевых и нецелевых видов животных

Вакцина Plowright не вызывает клинических признаков у восприимчивого к чуме крупного рогатого скота крупного рогатого скота или азиатских буйволов. Вакцина LA-AKO не вызывает никаких клинических признаков, кроме легкой лихорадки у восприимчивого к чуме крупного рогатого скота. Ни один из них не распространяется путем контактной передачи восприимчивому к чуме крупного рогатого скота, содержащемуся в непосредственной близости от вакцинированных.

ii) Возврат к вирулентности

Вирус вакцины Plowright сохраняет свои аттенюированные характеристики в течение как минимум пяти пассажей назад у крупного рогатого скота и не имеет способности к передаче контактным путем. Любой субштамм штаммов Plowright или LA-AKO, используемый в производстве вакцины против чумы крупного рогатого скота, должен быть идентифицирован по письменным историческим записям, в которых прослеживается его происхождение от любого из этих вакцинных штаммов.

iii) Экологические факторы

Нет экологических фактов в отношении производства или применения вакцины против чумы крупного рогатого скота.

7.3.2 Требования к безопасности

i) Для животноводства

Обе вакцины защищают вакцинированных животных от клинического заболевания, вызванного вирулентной инфекцией чумы КРС.

ii) Для контроля и искоренения болезни

В целях ликвидации цель должна состоять в том, чтобы использовать вакцину для иммунизации всех восприимчивых животных в очаге и поблизости от него в максимально короткие сроки (Taylor et al., 2002).

7.3.3 Стабильность

Штаммы TCRV Plowright и LA-AKO очень стабильны при правильной лиофилизации и могут храниться в течение длительного времени при +4 или -20°C при условии, что продукт сохраняет вакуум или заполнен газообразным азотом. Скорость деградации лиофилизированных TCRV может быть изменена выбором криопротектора и вариациями в цикле сушки. Хорошие результаты были получены при использовании (а) стабилизатора 5% гидролизата лактальбумина/10% сахарозы, 72-74-часового цикла сушки при пониженном вакууме (≤ 13 Па), начальной сушки в течение 16 часов при -30°C и конечной температуре хранения 35°C, или (b) стабилизатора 1% глутамата натрия/0.3% поливинилпиролидон/10% стабилизатора сахарозы, 48-часового цикла сушки в условиях пониженного вакуума (≤ 10 Па), начальной сушки в течение 24 часов при - 45°C, конечной температуре хранения 22°C, и заполнения флакона газом азотом.

После восстановления либо в физиологическом растворе, либо в 1М сульфате магния вирус становится гораздо более термолабильным. Период распространения восстановленной вакцины в полевых условиях не должен превышать периода ее полураспада, но поскольку этот параметр зависит от температуры и колеблется от 8 до 24 часов в диапазоне от 4°C до 37°C, можно рекомендовать универсальный период в 4 часа.

## **7.4 Биотехнологические вакцины**

На данный момент среди утвержденных вакцин нет ни одной биотехнологической.

|  |
| --- |
| **МКС 11.220** |
|  |
| **Ключевые слова:** чума крупного рогатого скота, заражение крупного рогатого скота, болезни животных, идентификация возбудителя |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220** |
|  |
| **Ключевые слова:** чума крупного рогатого скота, заражение крупного рогатого скота, болезни животных, идентификация возбудителя |

**РАЗРАБОТЧИК**

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Заместитель**  **Генерального директора** |  | **Е.М. Амирханова** |
| **Руководитель**  **Департамента разработки НТД** |  | **А.Н. Сопбеков** |
| **Главный специалист**  **Департамента разработки НТД** |  | **А. О. Турумов** |