Изображение Государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ**

**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 Закона Республики Казахстан «О ратификации Соглашения таможенного союза по ветеринарно-санитарным мерам» № 305-V от 30 июня 2010 года, а также Постановления Республики Казахстан «Об утверждении критериев отнесения патогенных биологических агентов к вызывающим особо опасные инфекционные заболевания и перечня патогенных биологических агентов с учетом классификации патогенных биологических агентов по патогенности и степени опасности» № 895 от 11 ноября 2022 года

**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**

Вирусы энцефаломиелита восточных лошадей (ВЛЭ), энцефаломиелита западных лошадей (ЗЛЭ) и энцефаломиелита венесуэльских лошадей (ВенЛЭ) относятся к роду Alphavirus семейства Togaviridae. Несмотря на близкое родство, ВЛЭ, ЗЛЭ и ВенЛЭ отличаются генетически и антигенно. Естественная экология поддержания вируса обычно происходит через чередование заражения птиц и комаров (ВЛЭ и ЗЛЭ), комаров и грызунов (энзоотический цикл ВенЛЭ) или комаров и лошадей (эпизоотический цикл ВенЛЭ). Вирус ВЛЭ также был выделен от змей, и они могут играть роль хозяев-резервуаров. Клиническое заболевание может наблюдаться у людей и лошадей, которые являются случайными замыкающими хозяевами для вирусов ВЛЭ и ЗЛЭ. Однако у некоторых лошадей может развиться транзиторная виремия, которая, как предполагается, потенциально достаточна для передачи вируса ВКЭ комарам при соответствующих условиях.

Все три вируса классифицируются как альфавирусы, присутствующие в Северной и Южной Америке. ВЛЭ имеет штаммы, связанные как с Северной Америкой (преимущественно с центральной и восточной частью Соединенных Штатов Америки, Канадой и Центральной Америкой), так и с Южной Америкой. Южноамериканские штаммы ВЛЭ, ранее известные как штаммы II, III и IV, теперь известны как вирус Мадариага после того, как штаммы, вызвавшие вспышки в Дарьене, Панама, в 2010 году, привели к переоценке вирусного секвенирования и реклассификации южноамериканского штамма ВЛЭ (вирус Мадариага) как отдельного дивергентного штамма. Исторически сложилось так, что ВЛЭ был обнаружен преимущественно в западной части США и Канады, Мексике, Центральной и Южной Америке. Вирус Highlands J, антигенно родственный вирусу ВЛЭ, был выделен в восточной части США. Хотя принято считать, что вирус Highlands J не вызывает заболевания у млекопитающих, он был выделен из мозга лошади во Флориде, умершей от энцефалита. Эпизоотические вирусы ВЛЭ были выявлены в Центральной и Южной Америке, причем последний раз они распространились на юг США из Мексики в 1971 году.

Клинические признаки ВЛЭ, ЗЛЭ и ВенЛЭ могут быть идентичными. Заболевание, вызванное любым из этих трех вирусов, также известно как сонная болезнь. После инкубационного периода в 1-14 дней, в зависимости от вируса и штамма, клинические признаки проявляются в виде лихорадки, анорексии и депрессии. Предположительный диагноз вирусного энцефаломиелита лошадей у невакцинированных лошадей можно поставить, если характерная сонливость наблюдается летом в умеренном климате или во влажный сезон в тропическом и субтропическом климате, когда комаров-переносчиков много. Однако ряд других заболеваний, таких как вирус Западного Нила (глава 3.1.25 Руководства Международного эпизоотического бюро (МЭБ)), бешенство (глава 3.1.18 Руководства Международного эпизоотического бюро (МЭБ)) и другие инфекционные, паразитарные или неинфекционные агенты могут вызывать схожие клинические признаки, и диагноз должен быть подтвержден описанными методами диагностического исследования.

Вирус ВЛЭ вызывает тяжелое заболевание у людей с уровнем смертности 30-70% и высокой частотой необратимых неврологических последствий у выживших пациентов. Североамериканский вариант считается более патогенным, чем южноамериканские штаммы (вирус Мадариага). По имеющимся данным, вирус ВЛЭ вызывает заболевание у других млекопитающих, помимо лошадей и людей, включая коров, овец, свиней, белохвостых оленей и собак. Вирусные инфекции ВЛЭ обычно наблюдаются в ограниченных географических районах. У взрослых людей ЗЭЭ обычно протекает в легкой форме, но у детей может быть тяжелым заболеванием. Летальность составляет от 3 до 14%. Инфицирование лошадей вирусом ЗЛЭ исторически наблюдалась на обширной географической территории, например, спорадические случаи наблюдались на площади 2590 км2 (1000 квадратных миль), однако с 1999 года вспышек заболеваний, вызванных вирусом ЗЛЭ, не было.

Большинство инфекций энцефаломиелита у домашних птиц вызывается вирусом ВЛЭ и происходит в штатах восточного побережья США. Единичные случаи высокой смертности среди выращенных в неволе пернатых, в основном фазанов, чукаров, аквариумных пингвинов и перепелов, были связаны с заражением вирусами ВЛЭ, ЗЛЭ или Highlands J. Хотя вирус заносится комарами, передача внутри стаи происходит в основном путем подбирания перьев и каннибализма. Вирусы ВЛЭ и ЗЛЭ вызывали смертельные заболевания у ратитов. Геморрагический энтерит наблюдался у эму, инфицированных вирусами ВЛЭ и ЗЛЭ, а уровень заболеваемости и смертности может превышать 85%. Было установлено, что вирусы ВЛЭ и Highlands J вызывают депрессию, сонливость, снижение яйценоскости и повышенную смертность у индеек.

Вирусный комплекс ВенЛЭ состоит из шести подтипов (I-VI). Подтип I включает пять антигенных вариантов (AB-F), из которых варианты I-AB и I-C связаны с эпизоотиями ВенЛЭ у лошадей и одновременными эпидемиями у людей. Первоначально подтипы I-A и I-B считались разными вариантами, но сейчас они рассматриваются как идентичные (I-AB). Считается, что эпизоотические варианты I-AB и I-C происходят от мутаций энзоотического серотипа 1-D; изоляты I-AB и I-C были получены только во время эпизоотий лошадей. Энзоотические штаммы включают варианты I-D, I-E и I-F подтипа I, подтип II, четыре антигенных варианта (A-D) подтипа III и подтипы IV-VI. Обычно энзоотические вирусы ВенЛЭ не вызывают клинического энцефаломиелита у лошадей, но в 1993 и 1996 годах в Мексике энзоотический подтип 1-E вызвал ограниченные эпизоотии у лошадей (Эстрада-Франко и др., 2004). Энзоотические варианты и подтипы могут вызывать клинические заболевания у людей.

Исторически эпизоотия ВенЛЭ ограничивалась северной и западной частью Южной Америки (Панамериканская организация здравоохранения, 1972). Однако с 1969 по 1972 год эпизоотическая активность (вариант 1-AB) наблюдалась в некоторых частях Северной и Центральной Америки. Эпизоотии ВенЛЭ, вызванные вирусом I-AB или I-C, не возникали в Северной Америке с 1972 года. Изолятами эпизоотического вируса ВенЛЭ для лошадей и людей были штаммы подтипа I-C из Венесуэлы в 1993, 1995, 1996, 1999, 2000, 2003 годах и Колумбии в 1995 году. Кроме того, вариант I-AB был выделен от дозорных хомяков в Венесуэле).

Очаги энзоотических вариантов и подтипов встречаются в районах, классифицируемых как тропические влажные леса, т.е. в районах с высоким уровнем грунтовых вод или открытых болотистых местностях с меандрирующими освещенными солнцем ручьями. Это те районы Америки, где осадки выпадают в течение всего года, или районы, постоянно обеспеченные водой. Энзоотические вирусы циркулируют среди грызунов и, возможно, птиц, питаясь комарами. Энзоотические штаммы вируса ВенЛЭ были идентифицированы в Эверглейдс Флориды (подтип II), Мексике (вариант I-E), странах Центральной Америки (вариант I-E), Панаме (варианты I-D и I-E), Венесуэле (вариант I-D), Колумбии (вариант I-D), Перу (варианты 1-D, III-C и III-D), Французской Гвианы (вариант III-B и подтип V), Эквадора (вариант I-D), Боливии (вариант I-D), Суринама (вариант III-A), Тринидада (вариант III-A), Бразилии (варианты I-F, III-A и подтип IV) и Аргентины (подтип VI). В нетипичной экологической нише вариант III-B был выделен в США (Колорадо и Южная Дакота) в необычной ассоциации с птицами, а вирус Эверглейдс - это вирус ВенЛЭ подтипа II, который заражает грызунов и собак во Флориде.

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ**

**Основные положения**

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

**1 Область применения**

Настоящий стандарт содержит основные положения по определению лабораторной диагностики заболевания лошадей инфекционным энцефаломиелитом, а также устанавливает требования к лабораторной диагностике инфекционного энцефаломиелита.

Стандарт применяют при диагностировании заболевания животных инфекционным энцефаломиелитом в лабораториях, ветеринарных, научно-исследовательских учреждений.

Порядок проведения ветеринарных мероприятий по инфекционному энцефаломиелиту лошадей проводится согласно [1].

## 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.

Эпизоотический вариант вируса

**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 и значение болезни**

ВЛЭ, ЗЛЭ и ВенЛЭ - альфавирусы, способные вызывать заболевания как у людей, так и у лошадей, причем в большинстве клинических случаев - энцефалит. ВЛЭ, ЗЛЭ и ВенЛЭ обычно существуют в природе, чередуясь между позвоночными хозяевами и комарами-переносчиками.

Клинически болезнь у лошадей характеризуется лихорадкой, анорексией и тяжелой депрессией. В тяжелых случаях болезнь может перейти в повышенную возбудимость, слепоту, атаксию, тяжелую психическую депрессию, лежачее положение, конвульсии и смерть.

Инфекция вируса ВЛЭ у лошадей часто приводит к летальному исходу, в то время как вирус ЗЛЭ может вызывать субклиническое или легкое заболевание со смертностью менее 30%. Основными переносчиками вирусов ВЛЭ и ЗЛЭ являются воробьи, спорадические случаи ВЛЭ были зарегистрированы у коров, овец, свиней, оленей и собак. Однако у некоторых лошадей может развиться транзиторная виремия, которая может быть достаточной для передачи вируса ВенЛЭ комарам при соответствующих условиях.

Примечание - Вирусы ВенЛЭ считаются одним из наиболее опасных патогенов лошадей в Мексике, Центральной и Южной Америке. Например, одна эпидемия в Колумбии привела к гибели до 100 000 лошадей и 250 000 случаев заболевания людей.

В отличие от ВЛЭ и ЗЛЭ, лошади являются ключевым фактором в усилении вируса, распространении заболевания и поддержании эпизоотий ВенЛЭ. Комплекс вирусов ВенЛЭ включает шесть антигенных подтипов (I-VI). Внутри подтипа I существует пять антигенных вариантов (варианты AB-F). Первоначально подтипы I-A и I-B считались разными вариантами, но сейчас они считаются идентичными (I-AB). Антигенные варианты I-AB и I-C связаны с эпизоотической активностью у лошадей и людей. Три других варианта подтипа I (I-D, I-E, I-F) и пять других подтипов ВЕНЛЭ (II-VI) циркулируют в естественных энзоотических циклах. Лошади не являются конечными хозяевами для вируса ВенЛЭ; они служат в качестве амплифицирующих хозяев для эпизоотических штаммов ВенЛЭ, в то время как энзоотические вирусы ВенЛЭ циркулируют в основном в сильватических грызунах и комарах. Энзоотические варианты и подтипы считаются непатогенными для лошадей, но могут вызывать клинические заболевания у людей.

Примечание - В 1993 и 1996 годах ограниченные вспышки энцефалита у лошадей в Мексике были вызваны энзоотическими вирусами ВКЭ подтипа I-E. В последнее время спорадические вспышки происходили в Мексике, Центральной Америке, северных и западных районах Южной Америки. Энзоотические подтипы вируса у человека более широко распространяются на север Центральной Америки и Южную Америку.

**5 Выявление агента**

Предположительный диагноз ВЛЭ, ЗЛЭ и ВенЛЭ может быть поставлен, когда у восприимчивых лошадей проявляется характерная сонливость и другие признаки неврологического заболевания в районах, где активны насекомые-гематофаги. Характерные грубые поражения отсутствуют. Гистопатологические поражения могут служить предположительным диагнозом. Вирус ВЛЭ обычно можно выделить из мозга и иногда из других тканей мертвых лошадей, однако вирусы ЗЛЭ и ВенЛЭ выделяются очень редко. Вирусы могут быть выделены из полевых образцов путем инокуляции эмбриональных куриных яиц или клеточных культур. Вирус может быть идентифицирован с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR), фиксации комплемента (CF), иммунофлуоресценции или теста на нейтрализацию уменьшения бляшек (PRN).

Специфическая идентификация эпизоотических вариантов вируса ВенЛЭ может быть проведена с помощью непрямого флуоресцентного теста на антитела, или дифференциального PRN-теста с использованием моноклональных антител, специфичных для подтипа или варианта, или с помощью секвенирования нуклеиновых кислот.

**5.1 Идентификация агента**

**5.1.1. Культура in-vitro и in-vivo**

Окончательным методом диагностики ВЛЭ или ЗЛЭ является выделение вируса с последующим типированием. Вирус ВЛЭ обычно может быть выделен из мозга лошадей, если с момента появления клинических признаков до смерти лошади не прошло более 5 дней. Вирус ВЛЭ часто может быть выделен из ткани мозга даже при наличии высокого титра антител в сыворотке крови. Вирус ЗЛЭ редко выделяется из тканей инфицированных лошадей. Мозг является предпочтительной тканью для выделения вируса, но вирус был выделен и из других тканей, таких как печень и селезенка.

При инфекции ВЕНЛЭ виремия совпадает с началом пирексии в течение 12-24 часов после заражения. Виремия обычно заканчивается через 5-6 дней после начала инфекции и совпадает с выработкой нейтрализующих антител и появлением клинических неврологических признаков. Часто вирусы ВЕНЛЭ не удается выделить из мозга инфицированных лошадей. Образцы крови для выделения вируса следует брать у лихорадящих животных, которые тесно связаны с клиническими случаями энцефалита. Рекомендуется собрать набор этих тканей в двух экземплярах, один набор для выделения вируса, а другой набор в формалине для гистопатологического исследования. Образцы для выделения вируса следует отправлять охлажденными, если они могут быть получены в лаборатории в течение 48 часов после сбора; в противном случае их следует заморозить и отправить с сухим льдом. Полный набор тканей позволит провести диагностические методы для других заболеваний. Для выделения готовится 10%-ная суспензия тканей в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS), pH 7,8, содержащем бычий сывороточный альбумин (БСА) (фракция V; 0,75%), пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Суспензия осветляется центрифугированием при 1500 г в течение 30 минут.

Вирусы ВЛЭ, ЗЛЭ и ВЕНЛЭ могут быть выделены в ряде систем клеточных культур. Наиболее часто используемыми культурами клеток являются первичные фибробласты куриного или утиного эмбриона, непрерывные линии клеток почек африканской зеленой мартышки (Vero), почек кролика (RK-13) или почек детского хомячка (BHK-21). Изоляцию обычно пытаются проводить в колбах для клеточных культур площадью 25 см2. Конфлюентные клетки инокулируются 1,0 мл тканевой суспензии. После 1-2-часового периода поглощения клеточный монослой дважды промывают культуральной средой или PBS и добавляют поддерживающую среду. Культуры инкубируют в течение 6-8 дней и делают один слепой пассаж. Вирусы ВЛЭ, ЗЛЭ и ВЕНЛЭ вызывают цитопатическое изменение в культуре клеток. Культуры, которые кажутся инфицированными, замораживают. Жидкость из размороженных культур используется для идентификации вируса.

Суспензии тканей могут быть инокулированы через желточно-крестцовый канал в 6-8-дневные эмбриональные куриные яйца. У эмбрионов, зараженных этими вирусами, нет диагностических признаков или повреждений. Инокулированные эмбрионы должны инкубироваться в течение 7 дней, но смерть обычно наступает между 2 и 4 днями после инокуляции. Обычно если нет мертвых эмбрионов, из которых невозможно выделить вирус, делается только один проход.

Вирусные изоляты могут быть идентифицированы с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR), прямого или непрямого флуоресцентного теста на антитела или теста на нейтрализацию бляшек (PRN) с использованием поликлональных или моноклональных антител к специфическим вирусам, полученных коммерческим путем или приготовленных путем гипериммунизации животных с последующим сбором их сыворотки (или асцитной жидкости в случае мышей) и очисткой иммуноглобулинов.

**5.1.2 Молекулярные методы - обнаружение нуклеиновой кислоты**

**5.1.2.1 Обычная ПЦР с обратной транскрипцией**

Было описано несколько методов РТ-ПЦР для выявления вирусной РНК ВЛЭ, ЗЛЭ или ВЕНЛЭ в комарах и тканях позвоночных, хотя лишь немногие из них были широко валидированы для образцов млекопитающих. Для ускорения дифференциальной диагностики в случаях подозрения на ВЛЭ или арбовирусный энцефаломиелит Западного Нила у лошадей был разработан мультиплексный метод гнездовой RT-PCR. Этот анализ обладает повышенной скоростью и чувствительностью по сравнению с выделением вируса из культуры клеток и широко использовался в Национальной лаборатории вирусов Западного Нила США (NVSL3) в течение нескольких последующих арбовирусных сезонов. Последовательности праймеров, используемых в NVSL для выявления вирусной РНК ВЛЭ, ЗЛЭ и ВЕНЛЭ, приведены в таблице 2. Первая реакция проводится в одной пробирке и начинается с обратной транскрипции при 46-50°С (в зависимости от оптимального температурного диапазона используемого фермента) в течение 30 минут с последующей активацией полимеразы при 95°С в течение 15 минут. Затем проводится 35 циклов, состоящих из денатурации при 94°C в течение 45 секунд, отжига при 58°C в течение 45 секунд и элонгации при 72°C в течение 1 минуты. В конце реакции проводится дополнительный этап элонгации при 72°C в течение 9 минут. Вложенная ПЦР использует 1 мкл первого продукта ПЦР в 50 мкл реакционной смеси и проводится при следующих условиях циклирования: активация полимеразы при 95°C в течение 15 минут, 35 циклов, состоящих из описанных выше этапов с температурой отжига 46°C, с последующей финальной элонгацией при 72°C в течение 9 минут.

Также был разработан подход, направленный на выявление вариантов вируса ВЕНЛЭ с использованием одной пары вырожденных праймеров (Таблица 2). После обратной транскрипции при 46-50°C (в зависимости от используемого фермента) в течение 30 минут и денатурации при 94°C в течение 2 минут авторы рекомендуют сначала провести ПЦР (40 циклов), состоящую из денатурации при 94°C в течение 30 секунд, отжига при 64°C в течение 60 секунд и элонгации при 72°C в течение 30 секунд, дополненную окончательным удлинением при 72°C в течение 5 минут. Для вложенной реакции 2 мкл первого продукта ПЦР смешивают в 50 мкл реакционной смеси и подвергают начальной денатурации при 94°C в течение 2 минут, затем 40 циклов амплификации, состоящих из денатурации при 94°C в течение 30 секунд, отжига при 61°C в течение 40 секунд и элонгации при 72°C в течение 30 секунд. Затем проводится окончательное удлинение при 72°C в течение 5 минут.

##### **Таблица 2. Праймеры, используемые для выявления вирусной РНК ВЛЭ, ЗЛЭ и ВЕНЛЭ с помощью гнездовой РТ-ПЦР**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Вирус** | **Положение генома** | **Длина ампликона** | **Последовательность праймеров (5’ → 3’)** | **Источник** |
| ВЛЭ  (1й этап) | 9233–9797 | 565 | F: AGG-GCT-TAC-CTG-ATT-GAC R: GTA-ACG-CCA-GGA-GTA-TTG | НЛВС |
| ВЛЭ  (гнездовой) | 9571–9710 | 140 | F: GGC-TCA-AGA-GTC-AGG-AGA R: CGG-ATG-TGA-CAC-AAG-AGA | НЛВС |
| ЗЛЭ  (1й этап) | 9032–9621 | 590 | F: TAA-GTG-TGG-CGA-CTA-CAG R: TCA-GGC-AGT-CTC-TTC-TTG | НЛВС |
| ЗЛЭ  (гнездовой) | 9241–9575 | 335 | F: CTC-ACA-CGC-CTA-CAG-TCA R: AGT-GCC-TAC-CAG-GAT-AGC | НЛВС |
| ВЕНЛЭ I-  AB/C/D (1й этап) | 9215–9776 | 562 | F: AGC-CAG-TGC-ACA-AAG-AAG R: TAG-GTG-TTA-GCC-GGT-AAG | НЛВС |
| ВЕНЛЭ I-  AB/C/D (гнездовой) | 9536–9671 | 136 | F: GGG-TGG-GAG-TTT-GTA-TGG R: CCA-GGA-TGG-TGG-ACA-TAG | НЛВС |
| ВЕНЛЭ I-E  (1й этап) | 9611–10085 | 475 | F: GTA-ATC-CAC-ACG-GAC-TAC R: GCA-TAA-CCC-GCT-CTG-TTG | НЛВС |
| ВЕНЛЭ I-E  (гнездовой) | 9794–9955 | 162 | F: GCA-TGC-CTC-TGT-GCT-TAG R: ATT-TCA-GCA-AGC-GGG-TAG | НЛВС |
| ВЕНЛЭ все (1й этап) | 45–176 | 156 | F: ATG-GAG-AAR-GTT-CAC-GTT-GAY-ATC-G R: YTC-GAT-YAR-YTT-NGA-NGC-YAR-ATG-C | Пизано и др., 2012 |
| ВЕНЛЭ все (гнездовой) | 83–163 | 80 | F: ARG-AYA-GYC-CNT-TCC-TYM-GAG-C  R: CRT-TAG-CAT-GGT-CRT-TRT-CNG-TNA-C | Пизано и дрl., 2012 |

где,

F - прямой;

R - обратный.

Комбинация РТ-ПЦР с иммуноферментным анализом ("ИФА": РТ-ПЦР-ИФА) была использована в качестве метода идентификации патогенных для человека альфавирусов.

**5.1.2.2 ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени**

О мультиплексном выявлении вирусных РНК ВЛЭ и ЗЛЭ с помощью ПЦР в реальном времени уже сообщалось, однако этот метод не был широко оценен на полевых образцах. Чувствительный РТ-ПЦР в реальном времени для выявления североамериканских вариантов вирусной РНК ВЛЭ и ЗЛЭ был разработан и проверен на ограниченной группе полевых образцов; он продемонстрировал более высокую чувствительность по сравнению с выделением вируса в культуре клеток Vero. Праймеры и зонды (Таблица 3) были оценены с рядом синтетических РНК-конструкций, которые включали различные замен, присутствующих в североамериканских вариантах вирусов ВЛЭ и ЗЛЭ. Это подтвердило высокую чувствительность и специфичность реагентов, разработанных [3]. РТ-ПЦР в реальном времени начинается с обратной транскрипции при 46-50°С (в зависимости от используемого фермента) в течение 30 минут с последующей активацией Taq-полимеразы при 95°С в течение 15 минут. Затем проводится 45 циклов, состоящих из денатурации при 95°С в течение 15 секунд, отжига при 55°С в течение 30 секунд и элонгации при 72°С в течение 30 секунд.

РТ-ПЦР в реальном времени для выявления вируса ВЕНЛЭ была оценена на наборе синтетических РНК-олигонуклеотидов и нуждается в дальнейшей валидации на полевых образцах вируса ВЕНЛЭ. Это особенно важно, поскольку область генома nsP1, где были подобраны праймеры и зонды, является высококонсервативной у альфавирусов [4], и необходимо исключить возможность нежелательной перекрестной реактивности.

**Таблица 3. Праймеры и зонды для РТ-ПЦР в реальном времени к вирусам ВЛЭ, ЗЛЭ и ВЕНЛЭ. Оба зонда мечены FAM и гасятся BHQ1**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Вирус** | **Обозначение реагента** | **Положение генома** | **Последовательности (5’ → 3’)** | **Длина ампликона** |
| ВЛЭ | ВЛЭ 9391, праймер F | 9391–9411 | ACA-CCG-CAC-CCT-GAT-TTT-ACA | 69 |
|  | ВЛЭ 9459c, праймер R | 9459–9439 | CTT-CCA-AGT-GAC-CTG-GTC-GTC |  |
|  | ВЛЭ 9414 Зонд | 9414–9434 | TGC-ACC-CGG-ACC-ATC-CGA-CCT |  |
| ЗЛЭ | ЗЛЭ 10,248 праймер F | 10,248–10,267 | CTG-AAA-GTC-GGC-CTG-CGT-AT | 67 |
|  | ЗЛЭ 10,314c праймер R | 10,314–10,295 | CGC-CAT-TGA-CGA-ACG-TAT-CC |  |
|  | ЗЛЭ 10,271 Зонд | 10,271–10,293 | ATA-CGG-CAA-TAC-CAC-CGC-GCA-CC |  |
| ВЕНЛЭ | AlphaVIR966 праймер F | 151-178 | TCC-ATG-CTA-ATG-CYA-GAG-CGT-TTT- CGC-A | 98 |
|  | AlphaVIR966 праймер R | 248-225 | TGG-CGC-ACT-TCC-AAT-GTC-HAG-GAT |  |
|  | INEID-ВЕНЛЭV Зонд | 193-218 | TGA-TCG-ARA-CGG-AGG-TRG-AMC- CAT-CC |  |

где,

F - прямой;

R - обратный.

**5.2 Выявление антигена**

Иммуногистохимические (ИГК) процедуры очень полезны для диагностики ВЛЭ, поскольку они проводятся на фиксированных тканях [5]. Мишенью для ИГХ является белок оболочки вируса ВЛЭ. Исследуются некротические и воспаленные участки мозга. У лошадей, инфицированных вирусом ВЛЭ, положительное окрашивание наблюдается, прежде всего, в нейронах и связанных с ними дендритных отростках. Однако отсутствие выявления вирусного антигена в центральной нервной системе лошадей не исключает заражения.

**6 Серологические тесты**

Для серологического подтверждения инфекции вирусом ВЛЭ или ЗЛЭ требуется четырехкратное или более значительное увеличение или снижение титра антител в парных образцах сыворотки, взятых с разницей в 10-14 дней. У большинства лошадей, инфицированных вирусом ВЛЭ или ЗЛЭ, при клиническом проявлении болезни наблюдается высокий титр антител. Следовательно, предположительный диагноз может быть поставлен, если у невакцинированной лошади с соответствующими клиническими признаками обнаружены антитела только против вируса ВЛЭ или ЗЛЭ. В отличие от инфекции вирусами ВЛЭ и ЗЛЭ, появление клинических признаков и последующая выработка антител IgG против вируса ВЕНЛЭ происходит в ранние сроки после заражения. Развитие энцефалита происходит по-разному, поэтому у некоторых неврологических лошадей может не наблюдаться четырехкратного или большего увеличения титра антител в парных сыворотках. Сыворотка должна быть собрана при появлении клинических признаков и повторена через пять-девять дней для сравнения. Обнаружение IgM-антител с помощью ИФА может указывать на острую инфекцию или недавний контакт с вирусом, включая вакцинацию, поэтому интерпретация серологических данных должна быть более точной.

Результаты исследований должны проводиться в сочетании с клиническими признаками и эпизоотической ситуацией [6]. История вакцинации должна приниматься во внимание при интерпретации результатов любых серологических тестов, особенно тестов PRN или нейтрализации вируса (VN). Хотя энзоотические подтипы и варианты ВЕНЛЭ непатогенны для лошадей, инфекция стимулирует выработку антител, которые могут вступить в перекрестную реакцию в диагностических тестах с эпизоотическими вариантами вируса ВЕНЛЭ. Более того, могут наблюдаться перекрестные реакции между антителами против вирусов ВЛЭ и ЗЛЭ в таких тестах, как тесты фиксации комплемента (CF) и ингибирования гемагглютинации (HI). Антитела CF против вирусов ВЛЭ и ЗЛЭ появляются позже и не сохраняются; следовательно, тест CF менее полезен для серологической диагностики заболевания.

**6.1 Фиксация комплемента**

Тест фиксация комплемента (CF) часто используется для демонстрации антител, хотя антитела, обнаруженные с помощью теста CF, могут сохраняться не так долго, как антитела, обнаруженные с помощью тестов HI или PRN. В качестве антигена обычно используется экстракт мозга мыши в сахарозе/ацетоне. Положительный антиген инактивируется путем обработки 0,1% бета-пропиолактоном. Эффективность этой обработки должна быть подтверждена тестированием жизнеспособности с использованием культуры in-vivo или in-vitro до работы с антигеном на стенде.

При отсутствии международной стандартной сыворотки антиген следует титровать против местной положительной контрольной сыворотки. Нормальным антигеном, или контрольным антигеном, является аналогично выделенный и разведенный мозг мыши от неинокулированных мышей.

Сыворотки разводят на 1/4 в вероналовом забуференном физиологическом растворе, содержащем 1% желатина (VBSG), и инактивируют при 56°C в течение 30 минут. Титрование положительных сывороток может быть проведено с использованием дополнительных двукратных разведений. Антигены МВ и контрольный антиген (нормальный мозг мыши) разводят в VBSG до оптимального количества фиксации, определенного титрованием против положительных сывороток; комплемент морской свинки разводят в VBSG до содержания 5 гемолитических единиц комплемента-50% (CH50). Сыворотки, антиген и комплемент реагируют в 96-луночных круглодонных микротитровальных планшетах при 4°C в течение 18 часов. Эритроциты барана (SRBC) стандартизируются до концентрации 2,8%. Гемолизин титруют для определения оптимального разведения для используемой партии комплемента. Гемолизин используется для сенсибилизации 2,8% SRBC, и сенсибилизированные клетки добавляются во все лунки микротитровального планшета. Тест инкубируется в течение 30 минут при 37°C. Затем планшеты центрифугируются (200 g), и лунки оцениваются на наличие гемолиза.

Используются следующие контроли:

(a) сыворотка и контрольная сыворотка с 5 CH50 и 2,5 CH50 комплемента;

(b) CF антиген и контрольный антиген с 5 CH50 и 2,5 CH50 комплемента;

(c) разведения комплемента 5 CH50, 2,5 CH50 и 1,25 CH50; и

(d) лунки клеточного контроля, содержащие только SRBCs и разбавитель VBSG.

Эти контрольные лунки проверяют на антикомплементарную сыворотку, антикомплементарный антиген, активность комплемента, используемого в тесте, и целостность индикаторной системы SRBC в отсутствие комплемента, соответственно.

Для предотвращения антикомплементарных эффектов сыворотки должны быть отделены от крови как можно скорее после сбора и соответствующего свертывания. В тесте должны использоваться положительные и отрицательные контрольные сыворотки.

**6.2** **Ингибирование гемагглютинации**

Антиген для теста HI такой же, как описано выше для теста CF. Антиген разбавляют таким образом, чтобы количество, используемое в каждой гемагглютинирующей единице (HAU), было в четыре-восемь раз больше того, которое агглютинирует 50% РБК в тест-системе. Титр гемагглютинации и оптимальный pH для каждого антигена определяют с помощью гусиных РБК, разведенных в растворах pH от pH 5,8 до pH 6,6 с интервалом 0,2.

Сыворотки разводят 1:10 в боратном физиологическом растворе, pH 9,0, а затем инактивируют при 56°C в течение 30 минут. Для удаления неспецифических ингибиторов сыворотки используют обработку каолином. Как вариант, неспецифические ингибиторы могут быть удалены путем обработки ацетоном сыворотки, разведенной 1:10 в PBS, с последующим восстановлением в боратном солевом растворе. Перед использованием сыворотки должны быть поглощены путем инкубации с 0,05 мл объема отмытых упакованных гусиных РБК в течение 20 минут при 4°C.

После тепловой инактивации, обработки каолином и абсорбции, двукратные разведения обработанной сыворотки готовятся в боратном физиологическом растворе, pH 9,0 с 0,4% бовальбумина. Разведения сыворотки (0,025 мл/лунку) готовят в 96-луночном круглодонном микротитровальном планшете в двукратных разведениях в боратном солевом растворе, pH 9,0, с 0,4% бовальбумина. Антиген (0,025 мл/лунку) добавляют к сыворотке. Планшеты инкубируются при 4°C в течение ночи. РБК получают от нормальных белых самцов гусей и трижды промывают в декстрозе/желатине/веронале (DGV), затем готовят 7,0%-ную суспензию в DGV. Затем 7,0%-ную суспензию разводят 1:24 в соответствующем pH растворе и сразу же добавляют в планшеты по 0,05 мл на лунку. Планшеты инкубируются в течение 30 минут при 37°C. Положительные и отрицательные контрольные сыворотки включаются в каждый тест. Тест считается валидным только в том случае, если контрольные сыворотки дают ожидаемые результаты. Титры 1:10 и 1:20 являются подозрительными, а титры 1:40 и выше - положительными.

**6.3 Энзимно-связанный иммуносорбентный анализ**

В продаже имеется несколько наборов для определения IgM в образцах лошадей. ИФА проводится путем покрытия плоскодонных планшетов антителом захвата IgM лошади ("Саху и др., 1994). Приведенный ниже пример представляет собой общее описание процедуры, которая может варьироваться в зависимости от рекомендаций, разработанных производителем для достижения оптимального баланса между чувствительностью и специфичностью теста.

Антиэхиновое IgM антитело разводят в 0,5 М карбонатном буфере, рН 9,6, и 50-100 мкл этого раствора добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 1 часа, а затем при 4°C в течение ночи. Перед использованием планшеты с покрытием трижды промывают 200-300 мкл/лунку 0,01 М PBS, содержащим 0,05% ТЗЛЭН 20. После второй промывки добавляют 200 мкл/лунку PBS/ТЗЛЭн/5% обезжиренного сухого молока (или другого блокирующего реагента) и инкубируют планшеты при комнатной температуре в течение 1 часа. После инкубации планшеты снова трижды промывают PBS/ТЗЛЭн. Тестовую и контрольную сыворотки разводят 1/400 в 0,01 М PBS, рН 7,2, содержащем 0,05% ТЗЛЭН 20, и добавляют по 50 мкл в каждую лунку. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 90 минут, а затем трижды промывают. Затем во все лунки добавляют по 50 мкл вирусного антигена. Планшеты инкубируются в течение ночи при 4°C и промываются три раза. Затем добавляют 50 мкл конъюгированного с пероксидазой хрена моноклонального антитела (MAb), специфичного к используемому вирусному антигену. Пластины инкубируют в течение 60-90 минут при 37°C и затем промывают шесть раз. Наконец, добавляют 50 мкл свежеприготовленного субстрата ABTS (2,2'-азинобис-[3-этилбензо-тиазолин-6-сульфокислота]) и перекись водорода (0,1%), и пластины инкубируют при комнатной температуре в течение 15-40 минут. Поглощение света измеряется при 405 нм. Исследуемый образец считается положительным, если абсорбция исследуемого образца в лунках, содержащих антиген вируса, по крайней мере, в два раза превышает абсорбцию отрицательной контрольной сыворотки в лунках, содержащих антиген вируса, и по крайней мере в два раза абсорбцию образца, исследуемого параллельно в лунках, содержащих отрицательный контрольный антиген. Для обеспечения специфичности каждый образец сыворотки тестируется на реактивность как с вирусным антигеном, так и с контрольным антигеном.

**6.4 Нейтрализация уменьшения бляшек**

Тест нейтрализации уменьшения бляшек (PRN) очень специфичен и может быть использован для дифференциации между ВЛЭ, ЗЛЭ и ВЕНЛЭ вирусными инфекциями. Тест PRN проводится в культурах клеток фибробластов утиного эмбриона, Vero или BHK-21 в колбах площадью 25 см2 или шестилуночных планшетах. Объемы, указанные ниже, относятся к колбам, и должны быть уменьшены вдвое, если тест проводится в шестилуночных планшетах. Перед тестированием сыворотка подвергается тепловой инактивации при 56°C в течение 30 минут. Она может быть проверена в конечном разведении 1/10 и 1/100. Конечные точки могут быть установлены с помощью тестов PRN или HI, если тестируются серийные разведения сыворотки (например, 2-кратное, 5-кратное, 10-кратное и т.д.). Это особенно полезно для парных образцов, полученных от одного животного и разделенных несколькими днями или ЗЛЭками. Сыворотка, используемая в тесте PRN, тестируется против 100 бляшкообразующих единиц (PFU) вируса (50 PFU для шестилуночных планшетов). Смесь вируса и сыворотки инкубируется при 37°C в течение 75 минут перед инокуляцией на монослои конфлюентных клеточных культур в колбах площадью 25 см2. Инокулят адсорбируется в течение 1 часа, после чего добавляется 6 мл среды наложения. Среда наложения состоит из двух растворов, которые готовятся отдельно. Раствор I содержит 2 × раствор основных солей Эрла без фенолового красного, 4% фетальной бычьей сыворотки, 100 мкг/мл гентамицина, 200 мкг/мл нистатина, 0,45% раствор бикарбоната натрия и 0,002% нейтрального красного. При использовании фибробластов утиного эмбриона раствор 1 также содержит 6,6% гидролизат лактальбумина дрожжевого экстракта. Раствор II состоит из 2% агара Нобля, который стерилизуют и поддерживают при температуре 47°C. Равные объемы растворов I и II доводят до 47°C и смешивают вместе непосредственно перед использованием. Тест инкубируется в течение 48-72 часов, а конечные точки определяются по 90% снижению количества бляшек по сравнению с контрольными колбами с вирусом, в которых должно быть около 100 бляшек.

**7 Требования к вакцинам**

Вакцины против ВЛЭ и ЗЛЭ безопасны и иммуногенны. Единственными рекомендуемыми вакцинами против ВенЛЭ являются вакцина из аттенуированного вируса, изготовленная из штамма TC-83, или инактивированные препараты вируса, также изготовленные из этого штамма. Аттенуированный вирус является иммуногенным при внутримышечном введении и может вызывать побочные реакции у реципиента.

Инактивированные формалином препараты вирулентного вируса ВенЛЭ не следует использовать для лошадей, так как после обработки формалином могут сохраняться остатки вирулентного вируса, вызывающие тяжелые заболевания как у животных, так и у людей. Эпизоотии ВенЛЭ возникали в результате использования таких обработанных формалином вирусов.

**8 Безопасность персонала**

Имеются сведения о тяжелых клинических заболеваниях и смерти, вызванных вирусами ВЛЭ и ЗЛЭ у работников лабораторий. Лабораторные манипуляции должны проводиться на соответствующем уровне биобезопасности и локализации, определенном на основе анализа риска. Рекомендуется, чтобы персонал был вакцинирован против вируса ВЛЭ. Также следует принимать меры предосторожности для предотвращения заражения человека при проведении посмертных исследований лошадей, подозреваемых в заражении вирусами энцефаломиелита лошадей.

Инфекции вируса ВенЛЭ у человека возникли в результате аэрозольной передачи от остатков клеток зараженных лабораторных грызунов и в результате несчастных случаев в лаборатории. Инфекции с эпизоотическими и энзоотическими вариантами и подтипами были получены работниками лабораторий. У людей могут возникать тяжелые клинические заболевания или наступать смерть. Те, кто работает с инфекционными вирусами ВенЛЭ или их антигенами, полученными из инфицированных тканей или клеточных культур, должны получить прививку и иметь нейтрализующие антитела, специфичные для вируса ВенЛЭ. Если вакцинация не является приемлемым вариантом, при проведении всех процедур рекомендуется использовать дополнительные средства индивидуальной защиты, включая средства защиты органов дыхания. Лабораторные манипуляции должны проводиться на соответствующем уровне биобезопасности и изоляции, определенном на основе анализа рисков [2].

**8.1 Диагностические техники**

##### Таблица 1. Тесты доступные для диагностики ВЛЭ, ЗЛЭ и ВЕНЛЭ и их цель

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | **Цель** | | | | | |
| **Свобода поппуляции от инфекции** | **Свобода отдельных животных от инфекции перед перемещением** | **Содействие политике искоренения** | **Подтверждение клинических случаев** | **Распространение инфекции -надзор** | **Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации** |
| Идентификация агента(a) | | | | | | |
| РТ-ПЦР | – | ++ | – | +++ | – | – |
| Изоляция в культуре клеток | – | ++ | – | +++ | – | – |
| Идентификация иммунного ответа | | | | | | |
| ИФА захвата | – | + | – | ++ | – | – |
| Нейтрализация уменьшения бляшек | +++ | + | – | ++ | +++ | +++ |
| Ингибирование гемагглютинации | + | ++ | – | ++ | ++ | ++ |
| (парные образцы) | – | + | – | ++ | – | – |

где,

+++ рекомендуемый метод;

++ рекомендуется, но есть ограничения;

+ подходит только в некоторых случаях;

– не подходит для этой цели.

Примечание - Рекомендуется сочетание методов идентификации агентов, применяемых к одному и тому же клиническому образцу.

**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] ЛАМБЕРТ А.Ж., МАРТИН Д.А. И ЛАНСИОТТИ Р.С. (2003). Обнаружение североамериканских вирусов восточного и западного энцефалита лошадей с помощью анализа амплификации нуклеиновых кислот. J. Clin. Microbiol., 41, 379-385.

[4] ЭШУ М.В., УАЙТХАУС К.А., ЗОЛЛ С.Т., МАССИРЕ К., ПЕННЕЛЛА Т.Т., БЛИН Л.Б., САМПАТ Р., ХОЛЛ Т.А., ЭККЕР ДЖ.А., ДЕСАИ А., ВАСИЛЕСКИ Л.П., ЛИ Ф., ТУРЕЛЛ М.Ж., ШИНК А., РУДНИК К., ОТЕРО Г., ВАВЕР С.К., ЛЮДВИГ Г.В., ХОФСТАДЛЕР С.А. И ЭККЕР Д.Ж. (2007) Прямое широкодиапазонное обнаружение альфавирусов в экстрактах комаров. Вирусология, 368, 286-295.

[5] БРАУН Т.М., МИТЧЕЛЛ К.ДЖ., НАСКИ Р.С., СМИТ Г.К. И РОЭРИГ Д.Т. (2001). Обнаружение вируса восточного лошадиного энцефалита в инфицированных комарах с помощью иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител с захватом антигена. Ам. Дж. Троп. Мед. Гиг., 65, 208-213.

[6] САХУ С.П., АЛЬСТАД А.Д., ПЕДЕРСЕН Д.Д. И ПЕРСОН Д.Е. (1994). Диагностика инфекции вируса восточного лошадиного энцефаломиелита у лошадей с помощью иммуноглобулинов M и G с помощью иммуноферментного анализа. J. Vet. Diagn. Invest., 6, 34-38.

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, инфекционный энцефаломиелит, болезнь лошадей, ветеринария, МЭБ, ВОЗЖ. |
|  |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, инфекционный энцефаломиелит, болезнь лошадей, 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** |