Изображение государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АТРОФИЧЕСКОГО РИНИТА**

**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](#_Toc138250652)

[2 Нормативные ссылки 1](#_Toc138250653)

[3 Обозначения и сокращения 1](#_Toc138250654)

[4 Методы диагностики 1](#_Toc138250655)

[5 Гистопатологические диагностические критерии 2](#_Toc138250656)

[6 Идентификация возбудителей 3](#_Toc138250657)

[6.1 В культуре in vitro 3](#_Toc138250658)

[6.2 Биохимические характеристики 3](#_Toc138250659)

[6.3 Молекулярные методы 5](#_Toc138250660)

[7 Серологические реакции 6](#_Toc138250661)

[8 Описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам 7](#_Toc138250662)

[8.1 Характеристики посевного вируса 7](#_Toc138250663)

[8.2 Способ изготовления 7](#_Toc138250664)

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА** **АТРОФИЧЕСКОГО РИНИТА**

**Основные положения**

**Дата введения**

# **1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной диагностики атрофического ринита.

# **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;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

ELISA - твердофазный иммуноферментный анализ;

CPE - цитопатический эффект в культурах ткани.

# **4 Методы диагностики**

Диагностика атрофического ринита проводится с использованием клинических, гистопатологических и микробиологических исследований, при этом последние особенно важны для стад с субклинической инфекцией. Обычно считается, что, если в стаде имеется токсинообразующий штамм P. multocida, стадо считается пораженным прогрессирующим атрофическим ринитом, независимо от того, есть ли клинические признаки этого заболевания (Педерсен и соавт., 1988). Поэтому во многих странах контроль направлен на выявление инфекции, даже при субклинической инфекции у животных, которые считаются потенциальными носителями инфекции.

**Таблица 1 – Методы диагностики атрофического ринита и их назначение**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | Назначение | | | | | |
| Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельных животных до перемещения | Содействие политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Превалентность инфекции - надзор | Иммунный статус у отдельных животных или в популяции после вакцинации |
| Выявление возбудителя | | | | | | |
| Культурное и биохимическое испытание | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| ПЦР в режиме реального времени | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - |
| Стандартный ПЦР | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - |
| Твердофазный ИФА для *P. multocida toxin* | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - |
| Выявление иммунной реакции | | | | | | |
| Твердофазный ИФА для *P. multocida* toxin | - | - | - | - | - | ++ |
| Твердофазный ИФА или испытание скоплений  *B. bronchiseptica* |  |  | Не указано |  |  | ++ |
| \* Рекомендуется сочетание методов идентификации агентов, применяемых на одном и том же клиническом образце | | | | | | |

# **5 Гистопатологические диагностические критерии**

Атрофия носовой раковины может быть выявлена при убое, при изучении разрезов рыла на уровне первого/второго премоляра. Субъективная оценка атрофии носовой раковины является удобным способом и часто используется для мониторинга стад (Брокмейер и соавт., 2012), но для исследований, требующих анализа данных, лучше подходят объективные шкалы измерения (Гатлин и соавт., 1996). Рентгенографическое (Дан, 1976) и томографическое (Магиар и соавт., 2013) исследования могут предоставить объективные данные по живым животным, при этом томография позволяет выявить не только тяжелые поражения, но и более незначительные изменения, которые нельзя обнаружить рентгенологически. Однако эти методы имеют ограниченное использование, потому что для них требуется специальное оборудование и опыт работы с ним. Диагностике способствует выявление характерных гистопатологических признаков, включая фиброзное изменение костной ткани вентральной части носовой раковины при различной степени воспалительных и репаративных изменений.

# **6 Идентификация возбудителей**

## **6.1 В культуре in vitro**

Поскольку P. multocida преимущественно колонизирует миндалины, ее чаще всего выделяют с использованием мазков или биоптата миндалин (Акерман и соавт., 1994). Мазки из носовой полости особенно полезны для выделения B. bronchiseptica. Если взятие проб из миндалин не представляется возможным, для выделения обоих микроорганизмов можно использовать мазки из полости носа. Следует использовать тампоны на гибком держателе; забор проб у молодых поросят легче проводить с использованием небольших тампонов. Одним тампоном берут пробы с обеих сторон носовой полости, после чего его помещают в непитательную транспортную среду (например, фосфатно-солевой буфер) и хранят при 4–8°C при перевозке в целях предотвращения избыточного роста других бактерий, характеризующихся более быстрым ростом. Время перевозки не должно превышать 24 ч.

Хотя и P. multocida, и B. bronchiseptica хорошо растут на кровяном агаре, лучше использовать селективную среду, поскольку их выявлению может препятствовать избыточный рост других бактерий, присутствующих в большом количестве. Еще одной трудностью при выделении B. bronchiseptica является то, что этот микроорганизм растет медленнее, чем большинство других бактерий, присутствующих в клинических образцах. Для выделения P. multocida используются различные составы сред, содержащие антибиотики, но сравнительные исследования, имеющиеся в литературе, показывают, что наивысшая частота выделения этого микроорганизма наблюдается при использовании модифицированной среды Найта (кровяной агар с бычьей кровью, содержащий 5 мкг/мл клиндамицина, 0,75 мкг/мл гентамицина) (Ларивиер и соавт., 1993) или KPMD (кровяной агар с бычьей кровью, содержащий 3,75 ед./мл бацитрацина, 5 мкг/мл клиндамицина, 0,75 мкг/мл гентамицина и 2,25 мкг/мл амфотерицина B) (Акерман и соавт., 1994). Агар Мак-Конки с 1% глюкозы и 20 мкг/мл фуральтадона используется во многих лабораториях как селективная среда для выращивания B. bronchiseptica из мазков из носовой полости, однако модифицированная среда Смита-Баскервиля (пептонный агар, содержащий 20 мкг/мл пенициллина, 20 мкг/мл фуральтадона и 0,5 мкг/мл гентамицина) демонстрирует превосходство, особенно если количество бактерий B. bronchiseptica низкое (Ларивиер и соавт., 1993; Смит и Баскервиль, 1979). Еще большая частота выделения отмечена при использовании кровяного агара, содержащего 40 мкг/мл цефалексина (Ларивиер и соавт., 1993). Кроме того, была описана селективная среда для одновременного выделения P. multocida и B. bronchiseptica, представляющая собой кровяной агар, содержащий 5 мг/л клиндамицина гидрохлорида, 0,75 мг/л гентамицина сульфата, 2,5 мг/л K-теллурита, 5 мг/л амфотерицина B и 15 мг/л бацитрацина (Де Джонг, Борст, 1985). Однако следует отметить, что K-теллурит иногда ингибировал рост P. multocida типа (Ларивиер и соавт., 1993).

## **6.2 Биохимические характеристики**

6.2.1 Общие положения

Pasteurella multocida является грамотрицательной биполярной плеоморфной палочкой и образует на кровяном агаре негемолитические сероватые колонии с характерным «сладковатым» запахом. Она не растет на агаре Мак-Конки, но дает положительную реакцию на оксидазу и каталазу и образует индол.

Bordetella bronchiseptica также представляет собой грамотрицательную палочку, образующую на кровяном агаре или среде Борде-Жангу выпуклые колонии диаметром 1–2 мм, обычно гемолитические, после 48 ч роста. Она не образует ферментов, но дает положительную реакцию на оксидазу, каталазу, цитрат и мочевину и растет при 6,5% NaCl.

Для подтверждения идентификации изолятов B. bronchiseptica были описаны варианты реакции агглютинации с использованием специфических антисывороток, но соответствующие сыворотки отсутствуют в широком доступе.

6.2.2 Оболочечное типирование P. multocida

Оболочечное типирование P. multocida полезно для эпидемиологических целей, поскольку P. multocida часто имеет слизистую оболочку. Традиционно используется серотипирование на основе реакции непрямой гемагглютинации (Картер, 1955), но лишь несколько лабораторий во всем мире делают и сохраняют требуемые антисыворотки. Однако для различения большинства выделенных от свиней изолятов обычно используются более простые химические методы. Штаммы, образующие оболочку типа D, дают сильную флокуляцию в водном растворе акрифлавина 1/1000 (Картер, Субронто, 1973), а штаммы с оболочкой типа A можно идентифицировать по ингибированию роста в присутствии гиалуронидазы (Картер, Ранделл, 1975). Небольшая часть свиных изолятов не имеет оболочки.

6.2.3 Проведение реакции с акрифлавином для P. multocida с оболочкой типа D

i) Проводят посев каждого испытуемого изолята P. multocida в пробирку, содержащую 3 мл бульона с сердечно-мозговым экстрактом, с использованием свежей культуры на кровяном агаре с бычьей кровью. В качестве положительного и отрицательного контроля используют известный штамм с оболочкой типа D и известный штамм с оболочной типа A.

ii) Засеянные пробирки инкубируют при 37°C в течение 18–24 ч.

iii) Осаждают бактерии с помощью центрифугирования и отбрасывают 2,5 мл надосадочной жидкости.

iv) Добавляют 0,5 мл водного раствора 1/1000 нейтрального акрифлавина. Раствор акрифлавина хранят не более одной недели при 4°C в защищенном от света месте.

v) Размешивают для ресуспендирования осадка бактерий и инкубируют пробирку при комнатной температуре без встряхивания.

vi) Через 5 мин осматривают на предмет появления выраженного хлопьевидного осадка.

6.2.4 Проведение реакции с гиалуронидазой для P. multocida с оболочкой типа A

i) Готовят свежие культуры испытуемых изолятов на кровяном агаре с бычьей кровью. В качестве положительного и отрицательного контроля используют известный штамм с оболочкой типа A и известный штамм с оболочкой типа D.

ii) Каждый испытуемый штамм высевают на отдельную чашку с триптиказо-соевым кровяным агаром с 5% овечьей крови или 6% бычьей крови, делая петлей несколько параллельных линий на расстоянии примерно 3–5 мм друг от друга вдоль диаметра чашки. Для максимальной продукции гиалуроновой кислоты важно, чтобы чашки были свежими, без обезвоживания.

iii) Линиями густо высевают образующий гиалуронидазу штамм Staphylococcus aureus под прямым углом к линиям роста P. multocida.

iv) Чашки инкубируют при 37°C во влажной атмосфере и периодически осматривают в течение до 24 ч. Штаммы типа A должны продемонстрировать выраженное ингибирование роста на участках близ линий роста S. aureus.

6.2.5 Типирование соматического антигена P. multocida

Различия липополисахаридов клеточной стенки штаммов P. multocida обеспечивают основу для типирования соматических антигенов. В реакции гель-диффузионной преципитации можно выявить 16 типов (Хедлестон и соавт., 1972), при этом у свиней чаще всего обнаруживается тип 3. Хотя требующаяся для этого антисыворотка отсутствует в широком доступе, многие референтные лаборатории и некоторые диагностические лаборатории проводят типирование соматического антигена.

6.2.6 Обнаружение токсина P. Multocida

Диагностика прогрессирующего атрофического ринита зависит от характеристики изолятов P. multocida как токсинообразующих. Термолабильный токсин P. multocida вызывает некроз кожи у морских свинок и приводит к гибели мышей при внутрибрюшинном введении. Токсинообразование может также быть продемонстрировано in vitro в результате изучения цитопатического действия в монослоях клеток легких эмбриона крупного рогатого скота (EBL) (Раттер, Лютер, 1984), клеток почек африканских зеленых мартышек (Vero) (Пеннингс, Сторм, 1984) или клеток носовой раковины крупного рогатого скота (Именс и соавт., 1988). Бактерии выращивают в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, инкубируемым при 37°C в течение 24 ч, а затем осаждают путем центрифугирования. Надосадочную жидкость стерилизуют путем фильтрования и титруют на монослоях культуры клеток в микротитровальных планшетах. После инкубации при 37°C в течение 2–3 дней монослои окрашивают кристаллическим фиолетовым и изучают под микроскопом для выявления цитопатического действия. Быстрый тест на культуре клеток, в котором подозрительные колонии выращивают на агаровой аппликации на клетках EBL (Чантер и соавт., 1986), обеспечивает более эффективный анализ большого количества изолятов.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для обнаружения токсина P. multocida, доступный для приобретения в некоторых странах, можно использовать для тестирования смесей бактерий, выделенных из первичной изоляционной среды. Это важное преимущество, поскольку свиньи могут одновременно быть колонизированы смесью токсинообразующих и нетоксинообразующих штаммов (Акерман и соавт., 1994; Брокмейер и соавт., 2012). При использовании методов культуры клеток потребовалось бы изучение каждой колонии P. multocida в образце, что практически невозможно, чтобы достигнуть того же уровня чувствительности, что в твердофазном ИФА. Твердофазный иммуноферментный анализ также подходит для применения с отдельными изолятами. Хотя данный метод отличается высокой специфичностью, наличие положительного результата без наличия заболевания в прошлом или без признаков, позволяющих подозревать данное заболевание, требует тщательных исследований для выделения токсинообразующих изолятов от животных, пробы которых были исследованы.

## **6.3 Молекулярные методы**

Основой идентификации токсинообразующих штаммов P. multocida и B. bronchiseptica во многих лабораториях являются морфология колоний и биохимические методы. Однако существует много методов анализа, основанных на использовании ДНК-зондов (Камп и соавт., 1996; Лихтенштайгер и соавт., 1996; Накаи и соавт., 1994; Регистер и Делонг, 2006) или полимеразной цепной реакции (ПЦР (Шеррер и соавт., 2016) для выявления токсинообразующих штаммов P. multocida и/или B. bronchiseptica от свиней, которые представляют собой более быстрые, более специфичные и более чувствительные диагностические методы. Диагностические лаборатории все чаще используют ПЦР для идентификации этих возбудителей, поскольку оборудование и опыт становятся все более доступными. Важное значение имеет надлежащая внутренняя валидация с известными контролями, а также стандартизированный непрерывный контроль качества (см. главу 1.1.6. «Принципы и методы валидации диагностических наборов для анализа инфекционных заболеваний»).

Нуклеотидные последовательности пар праймеров, используемые Регистром и ДеДжонгом (2006) для традиционного ПЦР-обнаружения B. bronchiseptica и токсикогенного P. multocida, соответственно, записаны с 5' по 3':

Fla4: TGG-CGC-CTG-CCC-TAT-C / Fla2: AGG-CTC-CCA-AGA-GAG-AAA-GGC-TT

toxA-7: ACT-ACA-GAT-TCC-TAA-CAA-AGG-TTC-TGG / toxA-6: TGC-TCA-AAT-CCT-AAA-TCA-CCT-TGT

Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда, описанные для ПЦР в реальном времени для обнаружения токсикогенных P. multocida (Шеррер и соавт., 2016), записаны с 5' по 3:

toxA-F: GAA-ATG-GCT-GGA-AAA-ACC-AGT-G / toxA-R: GAA-AAG-GCG-CTG-AAA-TTA-CTG-TAT-C

toxA-зонд: CGG-CTG-ATT-TAA-TAC-GCT-TTG-CCT-TGC

Множественная ПЦР для типирования оболочки P. multocida (Таунсенд и соавт., 2001) представляется методом, дающим более надежные результаты, чем фенотипические методы, и часто используется в имеющих соответствующее оборудование диагностических лабораториях. Различные методы фингерпринтинга ДНК, включая рестрикционный эндонуклеазный анализ (REA), риботипирование, гель-электрофорез в импульсном поле и методы на основе ПЦР были оценены различными группами исследователей на предмет использования для различения изолятов P. multocida. Было проведено несколько прямых сопоставлений методов с использованием штаммов, выделенных от свиней с атрофическим ринитом, но в настоящее время REA является методом выбора для эпидемиологических исследований, поскольку обеспечивает высокий уровень различения штаммов без необходимости в особом оборудовании или реактивах (Джорджевич и соавт., 1998; Гарднер и соавт., 1994; Гарел и соавт., 1990).

# **7 Серологические реакции**

В настоящее время нет пригодных серологических реакций, позволяющих надежно выявлять животных, инфицированных токсинообразующими штаммами P. multocida, у которых может развиться заболевание или которые могут передавать инфекцию. Выявление антител к P. multocida не может быть полезным, поскольку нетоксинообразующие штаммы имеют много антигенов, обладающих перекрестной реактивностью с антигенами токсинообразующих штаммов. Для выявления антител к токсину P. multocida был разработан метод твердофазного ИФА (Фогед, 1992; Такада-Ивао и соавт., 2007). Однако у многих животных, инфицированных токсинообразующими штаммами P. multocida, не образуются антитела к токсину, и широкое использование содержащих токсоид вакцин ограничивает диагностическую ценность этого метода твердофазного ИФА стадами, в которых не проводилось вакцинации, и выявлением реакции на вакцину в вакцинированных стадах. Инфицирование B. bronchiseptica можно выявить серологически с помощью реакции агглютинации с обработанными формалином бактериями или с использованием более чувствительного метода твердофазного ИФА (Вениер и соавт., 1984). Если речь не идет о мониторинге состояния серонегативного стада, обнаружение антител к B. bronchiseptica не имеет значения, поскольку этот микроорганизм присутствует во многих внешне здоровых стадах свиней.

# **8 Описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам**

## **8.1 Характеристики посевного вируса**

8.1.1 Биологические характеристики исходного посевного материала

Для штаммов бактерий, используемых для получения цельноклеточных бактеринов, а также для штаммов, из которых получают очищенные антигены, следует использовать систему посевных серий. В случае цельноклеточных бактеринов следует описать происхождение и историю штаммов P. multocida и B. bronchiseptica и дать полную характеристику исходного посевного материала в протоколе серии исходного посевного материала. Bordetella bronchiseptica, используемая для изготовления вакцины, должна быть представлена вирулентной культурой фазы I, а используемые изоляты P. multocida должны быть токсинообразующими. Рабочий посевной материал, используемый для производства вакцины, должен быть получен из исходного посевного материала, и все значимые свойства должны быть проверены в соответствии с протоколом серии исходного посевного материала.

8.1.2 Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних веществ)

Исходный посевной материал, и рабочий посевной материал должны представлять собой чистые культуры, не контаминированные бактериями, микоплазмами и вирусами. Соответствующие рекомендации приведены в Главе 1.1.9 Испытания на стерильность и отсутствие контаминации биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования. Подлинность видов бактерий и образование соответствующих антигенов должны быть подтверждены.

## **8.2 Способ изготовления**

8.2.1. Процедура

Точная информация по стандартам для производства эффективных коммерческих вакцин отсутствует, но известно, что они содержат 1010 формалинизированных клеток B. bronchiseptica и 10 мкг токсоида P. multocida в одной дозе. Для Bordetella bronchiseptica должно быть подтверждено, что культура находится в фазе I, а для P. multocida должно быть подтверждено, что культура содержит достаточные уровни токсина. Для производственной культуры следует использовать установленное количество пассажей. Клетки Bordetella bronchiseptica и клетки P. multocida и/или токсин инактивируются, детоксифицируются и соединяются с адъювантом. Поскольку токсин P. multocida является внутриклеточным и высвобождается при лизисе клеток в стационарной фазе, надосадочную жидкость следует забирать примерно через 48 ч после окончания экспоненциальной фазы роста.

8.2.2. Требования к ингредиентам

Все штаммы бактерий должны размножаться в средах, поддерживающих эффективный рост и обеспечивающих оптимальную экспрессию антигенов, важных для индукции образования защитных антител.

8.2.3 Внутрипроизводственный контроль

Семенные и производственные культуры высевают на чашки с кровяным агаром и инкубируют. На этих чашках не должно наблюдаться роста неспецифических колоний.

Культуры инактивируются формальдегидом. Проводятся испытания для проверки эффективности процесса инактивации и для анализа на остаточный формальдегид.

Количественное определение антигенов проводится путем подсчета общего количества клеток с использованием камеры для подсчета количества бактерий при определении количества целых клеток или путем определения массы антигенов для установленных антигенов, например, токсина P. multocida, с помощью количественного иммуноферментного анализа.

8.2.4 Испытания партии готового препарата

i) Стерильность

Каждая серия вакцины должна быть испытана на стерильность в соответствии со стандартными методами (см. главу 1.1.9), описанные в Европейской фармакопее или Своде федеральных нормативных документов США.

ii) Идентичность

Испытания идентичности должны проводиться для каждой партии вакцины с использованием стандартных методов, например, описанных в Европейской фармакопее или Своде федеральных нормативных актов соединённых штатов.

iii) Безопасность

Каждая серия вакцины должна быть испытана на безопасность у вида животных, для которых она предназначена, путем введения двойной дозы с использованием рекомендованного способа вакцинации, а затем введения одной дозы через 2 недели. Не должно наблюдаться аномальных местных или системных реакций. В случае использования консерванта концентрация должна определяться для каждой серии. Она не должна превышать максимально допустимый уровень. Испытания безопасности партий требуются, если безопасность продукта не продемонстрирована и не утверждена в регистрационном досье, а производство не соответствует описанному в главе 1.1.8.

iv) Активность партии

Каждая серия вакцины должна быть испытана на активность с использованием валидированного серологического метода, коррелирующего с защитой, выявленной при изучении эффективности, как описано в разделе C.2.3.2. Испытание на активность не обязательно проводится с животными, для которых вакцина предназначена – можно использовать мышей или кроликов. В этих случаях должна быть продемонстрирована корреляция уровней защитных антител с таковыми у целевого вида животных.

## **8.3 Требования к разрешению контрольно-надзорных органов**

8.3.1 Процесс производства

Для получения официального разрешения на вакцину все данные, касающиеся производства вакцины и контроля качества (см. Раздел C.2.1 Характеристики семян и Раздел C.2.2 Метод производства), должны быть представлены в соответствующие органы власти. Эта информация должна быть предоставлена по трем последовательным сериям вакцин объемом не менее 1/3 от объема стандартной промышленной партии.

8.3.2 Требования к безопасности

i) Реверсия вирулентности для аттенуированных/живых вакцин и экологические факторы

Ослабляющие генетические изменения в модифицированных живых вакцинах против B. bronchiseptica плохо изучены, но сообщений о реверсии вирулентности не поступало. Для получения разрешений контрольно-надзорных органов могут потребоваться исследования обратного пассажа, в которых вакцина последовательно пассируется на целевом животном определенное количество раз без признаков увеличения вирулентности.

ii) Меры предосторожности (опасности)

Хотя инактивация бактериальных культур утвержденным методом является стандартной процедурой, как B. bronchiseptica, так и P. multocida продуцируют дермонекротические токсины; детоксикация этих токсинов должна быть подтверждена, когда анатоксины используются в качестве компонентов вакцины.

Если в качестве адъюванта используется масляная эмульсия, случайное введение вакцины себе лицом, проводящим вакцинацию, может вызывать сильную местную реакцию. В таких случаях следует немедленно обратиться за медицинской помощью и обработать рану как рекомендуется в случае травмы с введением смазочных материалов.

Производители должны предоставить достаточные предупреждения о том, что в случае самовведения следует обратиться за медицинской помощью, с предупреждениями, указанными на этикетке продукта/в листе-вкладыше, чтобы лицо, делающее прививку, знало о любой опасности.

8.3.3. Требования к эффективности

Для регистрации коммерческой вакцины партия или партии, произведенные по стандартному методу и содержащие минимальное количество антигена или значение активности, должны доказать свою эффективность (защиту); каждая будущая коммерческая партия должна быть проверена перед выпуском, чтобы быть уверенным в том, что она имеет такое же значение активности, как и партии, использованные для испытаний эффективности

Обычно эта вакцина применяется на поздних сроках супоросности, чтобы потомство было защищено в результате получения антител с молозивом. Эффективность испытуемой вакцины должна быть определена путем вакцинирования групп супоросных свиноматок. Их потомство должно быть заражено вирулентными культурами B. bronchiseptica и токсинообразующими P. multocida. Должна иметь место выраженная профилактика клинических признаков атрофического ринита, т.е. атрофии носовой раковины. Сравнение клинических признаков у контрольных и вакцинированных животных может быть проведено в соответствии с системой баллов Дана (1976).

8.3.4. Продолжительность иммунитета

В рамках соответствующей процедуры утверждения разрешения контрольно-надзорных органов производитель должен продемонстрировать продолжительность иммунитета данной вакцины при помощи теста с нагрузкой или альтернативного теста в конце заявленного периода защиты.

Если вакцина может применяться независимо от стадии беременности, продолжительность иммунитета должна составлять не менее 6 месяцев, чтобы бустер-вакцинация два раза в год могла поддержать эффективные уровни антител.

8.3.5. Стабильность

В рамках соответствующей процедуры утверждения разрешения контрольно-надзорных органов производитель должен продемонстрировать стабильность всех свойств вакцины в конце заявленного периода срока годности. Должна быть указана температура хранения и должны быть указаны предупреждения, если продукт поврежден из-за замерзания или температуры окружающей среды.

Каждая серия вакцины должна проходить ускоренные испытания на стабильность при хранении с корреляцией с результатами испытаний на хранение в режиме реального времени.

## **8.4 Вакцины, основанные на использовании биотехнологических методов**

Было описано и исследовано в экспериментальных условиях много вакцин, содержащих ферментативно инертные субъединицы токсина P. multocida или полномолекулярный токсин, инактивированный в результате мутации. Рекомбинантные белки обычно экспрессируются Escherichia coli и перед использованием очищаются. В настоящее время в продаже имеется лишь несколько вакцин, содержащих рекомбинантный токсин или субъединицы токсина; они могут включать, а могут не включать бактерин P. multocida. Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что такие вакцины обеспечивают уровни токсиноспецифических антител, равные или более высокие, чем уровни, достигаемые при применении вакцин, содержащих нативный химически инактивированный токсоид.

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

|  |
| --- |
| **МКС 11.220** |
|  |
| **Ключевые слова:** лабораторная диагностика атрофического ринита, лабораторная диагностика атрофического ринита свиней, 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** |