Изображение государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Птица сельскохозяйственная**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА**

**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](#_Toc138260160)

[2 Нормативные ссылки 1](#_Toc138260161)

[3 Обозначения и сокращения 1](#_Toc138260162)

[4 Методы диагностики 1](#_Toc138260163)

[5 Идентификация возбудителя 2](#_Toc138260164)

[5.1 Общие положения 2](#_Toc138260165)

[5.2 Выделение вируса 2](#_Toc138260166)

[5.3. Иммунофлюоресценция 3](#_Toc138260167)

[5.4 Иммуноферментный анализ 4](#_Toc138260168)

[5.5 Гистопатология 4](#_Toc138260169)

[5.6 Молекулярные методы 4](#_Toc138260170)

[6 Серологические тесты 7](#_Toc138260171)

[6.1 Общие положения 7](#_Toc138260172)

[6.2 Иммуноферментный анализ 8](#_Toc138260173)

[6.3 Нейтрализация вируса 8](#_Toc138260174)

[7 Требования к вакцинам 9](#_Toc138260175)

[7.1 Характеристики посевного материала 9](#_Toc138260176)

[7.2 Метод производства 9](#_Toc138260177)

[7.3 Требования к одобрению регулирующих органов 10](#_Toc138260178)

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Птица сельскохозяйственная**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА**

**Основные положения**

**Дата введения**

# **1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению лабораторной диагностики инфекционного ларинготрахеита.

# **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;

C-ИФА - конкурентный иммуноферментный анализ.

# **4 Методы диагностики**

**Таблица 1 – Методы инфекционного ларинготрахеита и их назначение**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | Назначение | | | | | |
| Не зараженная популяция | Отсутствие заражения отдельных особей до перемещения | Участие в политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Распространенность инфекции – эпиднадзор | Иммунный статус у отдельных особей или популяций после вакцинации |
| Идентификация агента\* | | | | | | |
| Выделение вируса | - | - | - | ++ | - | - |
| Иммунофлуоресценция для выявления антигена¬ | - | + | - | ++ | - | - |
| ИФА - определение антигена | - | ++ | + | +++ | + | - |
| ПЦР |  | +++ |  | +++ | +++ | - |
| Гистопатология | - | - | - | ++ | - | - |
| Выявление иммунного ответа | | | | | | |
| НВ | + | - | + | - | - | + |
| ИФА - определение антител |  | + | +++ | + | +++ | +++ |

# **5 Идентификация возбудителя**

## **5.1 Общие положения**

Вирус можно выделить в печени куриных эмбрионов, почках куриных эмбрионов или в культурах клеток почек кур. Из них, наиболее чувствительными оказались монослои клеток печени куриного эмбриона (Hughes & Jones, 1988). Вирус также можно вырастить на отслоившейся хорион-аллантоисной оболочке (САМ) 10-12-дневных свободных от патогенной микрофлоры (СПФ) куриных яиц с эмбрионом (Jordan, 1964).

Вызывающий болезнь герпесвирус можно продемонстрировать непосредственно в трахеальном экссудате при помощи электронной микроскопии (Van Kammen & Spadbrow, 1976). Вирусные антигены можно выявить при помощи иммунофлюоресценции (Braune & Gentry, 1985; Wilks & Kogan, 1979), или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием соскобов со слизистой оболочки трахеи (York & Fahey, 1988). Также может быть полезным гистологическое исследование трахеи на предмет типичных герпесвирусных внутриядерных включений и синцитиальных клеточных образований (Pirozok et al., 1957). Для выявления нуклеиновой кислоты ИЛТВ используется как обычная полимеразная цепная реакция (ПЦР), так и полимеразная цепная реакция в реальном времени. Дополнительным преимуществом ПЦР в реальном времени является то, что она обеспечивает относительное количественное определение вирусных геномов на образец, что может указывать на стадию инфекции и уровень передачи вируса в стаде. Обычная ПЦР также полезна для диагностики ИЛТВ, поскольку продукты амплификации, полученные с помощью обычной ПЦР, могут быть секвенированы для дальнейшего генотипирования вируса (Menendez et al., 2014).

## **5.2 Выделение вируса**

Когда для выделения вируса отбираются пробы у живой птицы, трахеальные мазки являются более предпочтительными по сравнению с ротоглоточными мазками или мазками с конъюнктивы. Их помещают в транспортную среду, содержащую антибиотики. При отборе материала для выделения вируса при продолжительных вспышках, более эффективным будет выбраковывать птицу на ранней стадии заражения, чем пытаться выделить вирус у птицы, которая погибла от асфиксии после длительной болезни. Качество пробы улучшится, если птицу умертвят при помощи барбитурата или другой инъекции, а не методом смещения шейных позвонков. Можно представить целую голову и шею убитых птиц, или только трахею и гортань после их удаления с минимальной контаминацией. Трахеи следует транспортировать в бульоне с антибиотиком для выделения вируса, но если они предназначены для электронной микроскопии, их следует завернуть во влажную тонкую бумагу. Любое длительное хранение пораженных тканей должно происходить при -70°С или ниже для того, чтобы свести к минимуму потерю титров вируса. Следует избегать повторного замораживания и размораживания, так как это снижает инфекционность вируса.

Экссудат и эпителиальные клетки соскабливают с трахей, разводят приблизительно 1:5 в питательном бульоне, содержащем пенициллин и стрептомицин, и энергично взбалтывают. Полученную суспензию центрифугируют при низкой скорости для удаления дебрис, и 0,1 мл надосадочной жидкости вводят в отслоившуюся хорион-аллантоисную оболочку как минимум трех оплодотворенных куриных яиц, которые инкубировали в течение 10-12 дней. Яйца покрывают парафином и инкубируют при 37°С до 7 дней. Их просвечивают каждый день, и хорион-аллантоисную оболочку погибших эмбрионов или эмбрионов, выживших в течение 7 дней, исследуют на типичные вирусные поражения. Возможен альтернативный вариант: как минимум два сливающихся монослоя клеток печени куриных эмбрионов или клеток почек куриных эмбрионов, после удаления среды, заражают и оставляют для впитывания на 1-2 часа. Культуры покрывают свежей средой, инкубируют до 7 дней и проверяют ежедневно под микроскопом на наличие признаков типичного синцитиального цитопатогенного эффекта (ЦПЭ).

В каждом конкретном случае может понадобиться до трех пассажей материала, прежде чем образец будет считаться отрицательным. Изолят вируса можно подтвердить, как вирус ИЛТ при помощи реакции нейтрализации в яйцах или клеточной культуре с использованием гипериммунной антисыворотки к вирусу ИЛТ. В качестве альтернативы, вирусные частицы можно быстро идентифицировать в культуральной жидкости или в вирусных поражениях на хорион-аллантоисных оболочках при помощи электронной микроскопии, вирусные антигены – при помощи иммунофлюоресценции в зараженных вирусом ИЛТ клеточных культурах, залитых ацетоном, или в замороженных срезах хорионаллантоисной оболочки, и нуклеиновые кислоты вируса - при помощи ПЦР.

## **5.3. Иммунофлюоресценция**

В реакции иммунофлюоресценции для обнаружения вирусных антигенов, соскобы эпителиальных клеток из трахеи размазывают на предметном стекле. Кроме того, можно использовать криостатные срезы трахеи толщиной 5 мкм, мгновенно замороженные в жидком азоте. Препараты фиксируют в ацетоне при комнатной температуре в течение 10 минут. Их можно окрашивать непосредственно с использованием куриного иммуноглобулина против вируса ИЛТ, меченого флуоресцинизотиоцианатом (FITC) в течение 1 часа с последующим промыванием в течение 15 минут в ванне с фосфатнобуферным раствором (PBS), рН 7,2, и перемешивают магнитной мешалкой. В иных случаях можно провести их непрямое окрашивание с использованием подходящего разведения куриной сыворотки против ИЛТ в течение 1 часа. Предметное стекло тщательно промывают фосфатно-буферным раствором в течение 15 минут как описано выше, и антикуриный иммуноглобулин, меченый флуоресцинизотиоцианатом, наносят на 30 минут. После последнего промывания, покровные стекла помещают на невыцветающую гистологическую среду. Препараты исследуют на специфичную внутриядерную флюоресценцию в эпителиальных клетках с использованием микроскопа с эпифлуоресцентным ультрафиолетовым светом. Подходящие контроли – это известные незараженные образцы, а для непрямого метода – неиммунизированная куриная сыворотка. Следует соблюдать особую осторожность при анализе препаратов при непрямой иммунофлуоресценции, так как эндогенный куриный IgG в трахее может вызывать нежелательное связывание антикуриного IgG, меченого флуоресцинизотиоцианатом.

## **5.4 Иммуноферментный анализ**

Ряд наборов ИФА коммерчески доступны, и процедура анализа может изменяться в зависимости от набора; необходимо всегда следовать инструкциям производителя. Когда ИФА с моноклональными антителами используется для выявления вирусных антигенов (McNulty et al., 1985), трахеальный экссудат смешивают с равным объемом фосфатно-буферного солевого раствора, содержащего 1% (объем к объему) неионного, неденатурирующий детергента, затем встряхивают в течение 30 секунд и центрифугируют при 10,000 g в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость закапывают в количестве 50 мкл в лунки титрационных микропланшетов, на которые предварительно нанесли кроличий IgG против вируса ИЛТ, разводят 1:200 в 0,05 М карбонатного/бикарбонатного буфера, рН 9,0, и инкубируют в течение 1 часа. Затем 50 мкл моноклональных антител против основных гликопротеинов вируса ИЛТ, разведенных 1:50 в фосфатно-буферном солевом растворе, добавляют в каждую лунку, затем 50 мкл (разведение 1:1000) афинно-очищенного козьего антимышиного IgG конъюгируют с пероксидазой хрена. Хромоген/субстрат, 5-аминосалициловую кислоту (6,5 мм) с перекисью водорода (до конечной концентрации 0,0005%), добавляют в лунки в объеме 100 мкл. Через 30 минут планшеты считывают при 450 нм при использовании спектрофотометра, и показание абсорбции для каждой лунки корректируется путем вычитания показаний, полученных для лунок, содержащих разбавляющий буфер вместо трахеального экссудата. Положительная/отрицательная пороговая точка разделения берется, как среднее значение абсорбции для нескольких отрицательных (например, материал трахеи без вируса ИЛТ) образцов плюс 3 средних квадратических отклонения.

## **5.5 Гистопатология**

Птицы, отобранные для вскрытия, должны находиться в острой фазе болезни. Эвтаназия должна осуществляться с помощью внутривенной инъекции барбитурата или воздействием галотана, чтобы избежать повреждения трахеи. Трахеи для гистологического исследования следует поместить в 10% нейтральный забуференный формалин или фиксатор Боуина (предпочтителен для выявления внутриядерных телецвключений) сразу после извлечения из птиц, и, после фиксации залить парафином. Иногда исследуют веки и легкие. Внутриядерные включения можно увидеть в эпителиальных клетках трахеи после окрашивания гематоксилином и эозином. Синцитиальные клеточные образования часто присутствуют в экссудате и обычно содержат внутриядерные тельцавключения. Они являются классическими включениями Коудри типа А герпесвирусов, но они могут присутствовать только в течение 3-5 дней после заражения. В случаях тяжелой болезни, когда большинство зараженных клеток отслоилось от слизистой оболочки трахеи, включения можно увидеть в интактных клетках среди продуктов распада клеток в просвете трахеи. Продольные срезы трахеи по сравнению с поперечными срезами позволяют провести исследование всей длины органа.

## **5.6 Молекулярные методы**

5.6.1 Общие положения

Сообщалось о нескольких молекулярных методах для идентификации ДНК вируса ИЛТ в клинических образцах, но ПЦР оказалась самой полезной. Используя вложенную ПЦР, Humberd с соавторами. (2002) показали, что ДНК вируса ИЛТ может быть обнаружена в фиксированных формалином и залитых парафином тканях независимо от присутствия синцитиальных клеток, внутриядерных включений или того и другого.

Было установлено, что ПЦР более чувствительна, чем выделение вируса из клинических образцов, особенно при наличии других загрязняющих вирусов, таких как аденовирусы (Williams et al., 1994). Alexander и Nagy (1997) обнаружили, что с середины до конца инфекционной стадии ПЦР и выделение вируса имели схожую чувствительность, но ПЦР показывала лучшие результаты в стадии выздоровления.

Сочетание анализа ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) одного и многочисленных вирусных генов, и геномных областей, позволило охарактеризовать различные штаммы в стране или регионе (Chang et. al., 1997). В нескольких отчетах указывалось на то, что так как некоторые полевые штаммы являются близкородственными с и вероятно происходят от вакцинных вирусов, остальные являются действительно штаммами «дикого типа» (Ojkic et. al., 2006). Гены, повсеместно исследованные различными зарубежными авторами, включают ICP4, TK (тимидинкиназа), гликопротеин G (gG), гликопротеин Е (gE) и UL47. Oldoni и Garcia (2007) использовали 36 рестриктазы, в то время как другие использовали четыре.

Не существует молекулярного теста, общепризнанного для идентификации штаммов ИЛТВ, однако ниже в разделе B.1.5.1 приведен протокол. iv Полиморфизм длины рестрикционного фрагмента используется в ряде птицеводческих диагностических лабораторий для дифференциации вакцин и полевых штаммов, и эпидемиологических исследований. Положительная история вакцинации в стаде может помочь интерпретации результатов, хотя следует учитывать, что инфекция, вызванная полевым штаммом, может возникнуть у вакцинированных птиц. Вакцинные штаммы также иногда могут быть выделены из не вакцинированных птиц.

5.6.2 Процедуры тестирования

i) Традиционная ПЦР

В типичном протоколе ПЦР в отношении вируса ИЛТ, вирусную ДНК получают из клинических образцов (мазки, кусочки тканей), бляшек хорион-аллантоисных оболочек, надосадочной жидкости клеточной культуры или вакцин с использованием наборов для экстрагирования ДНК. Используемые праймеры можно получить, как описано в ранее опубликованной работе, или составить с использованием последовательностей вируса ИЛТ из международной базы данных Genbank.

Следующий протокол рутинно используют в ряде ветеринарных диагностических лабораторий для выявления вируса ИЛТ в клинических образцах, он обладает потенциалом для предварительного типирования вируса с помощью полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ампликонов ПЦР. Вся информация по ПЦР представлена в работе Kirkpatrick с соавторами (2006b). Вкратце, область тимидинкиназы ИЛТВ длиной приблизительно 2,24 т.п.н. амплифицируется с использованием пары прямых (5'-CTG-GGC-TAA-ATC-ATC-CAA-GAC-ATC-A-3') и обратных (5'-GCT-CTC-TCG-AGT-AAG-AAT-GAG-TAC-A-3') праймеры и полученные ампликоны разделяют электрофорезом в 0,8% агарозных гелях, окрашивают соответствующим красителем для нуклеиновых кислот и подвергают воздействию ультрафиолетового света для визуализации. Реакция амплификации объемом 50 мкл содержит по 200 мкм dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 1 mM MgCl2, 250 мкм каждого из праймеров, 1 мкл (2,5 единицы) Taq ДНК-полимеразы, 5 мкл 10 × Taq ДНК-полимеразного буфера и 5 мкл экстрагированной ДНК в качестве матрицы. Реакционная смесь инкубируется в течение 3 минут при температуре 94°С, затем подвергается 35 циклам в течение 15 секунд при температуре 94°С, в течение 45 секунд при 60°С и в течение 150 секунд при 72°С и в итоге инкубируется в течение 3 минут при температуре 72°С. В каждой серии ПЦР, контрольная пробирка, содержащая стерильную дистиллированную H2O, вместо экстрагированной ДНК, должна входить в состав отрицательного контроля.

Другой протокол, который использовался в ветеринарных диагностических лабораториях по всему миру для выявления и предварительного типирования вируса, включает амплификацию двух участков гена ICP4. Праймеры ICP4-1F (5'-ACT-GAT-AGC-TTT-TCG-TAC-AGC-ACG-3') и ICP4-1R (5'-CAT-CGG-GAC-ATT-CTC-CAG-GTA-GCA-3') амплифицируют фрагмент длиной 688 п.н. при позиции с 181 по 869 ; ICP4-2F (5'-CTT-CAG-ACT-CCA-GCT-CAT-CTG-3') и ICP4-2R (5'-AGT-CAT-GCG-TCT-ATG-GCG-TTG-AC-3') усиливают на 635 п.н. фрагмент в положении с 3804 по 4440 . Вся информация по данным ПЦР предоставлена в работе Chacon и Ferreira (2009).

Протокол ПЦР в реальном времени, описанный Mahmoudian et al. (2011), также может быть использован в качестве обычной ПЦР, при этом конечные продукты могут быть исследованы с помощью электрофореза в 2% агарозных гелях.

ii) ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени была описана для вируса ИЛТ (Creelan et. al., 2006; Mahmoudian et. al., 2011). Ее преимущество состоит в том, что ее можно провести менее чем за 2 часа и таким образом, она является очень быстрым методом диагностики ИЛТ по сравнению с традиционным выделением вируса или даже со стандартной ПЦР с последующим гель-электрофорезом. Следующий протокол может быть использован для быстрого выявления вируса ИЛТ в клинических образцах. Вся информация о методе представлена в работе Callison с соавторами, (2007). Вкратце, два олигонуклеотидных праймера, ILTVgCU771 (5'-

CCT-TGC-GTT-TGA-ATT-TTT-CTG-T-3') и ILTVgCL873 (5'-TTC-GTG-GGT-TAG-AGG-

TCT-GT-3'), используются для амплификации продукта длиной 103 пар оснований из гена ИЛТВ gC. Также используется зонд с флуоресцентной меткой ИЛТВ probe817 (5'-FAM-CAG-CTC-GGT-GAC-CCC-ATT-CTA-BHQ1-3'). Реакция проводится при помощи подходящих наборов ПЦР, например, с использованием 25 мкл общего объема, содержащего 10 мкл 2× мастер-микс, 0,5 мкм прямого и обратного праймеров, 0,1 мкм зонда, 1 мкл HK-UNG, и 5 мкл ДНК-матрицы. Инкубирование и получение данных осуществляется с использованием термоциклера в реальном времени, хотя протоколы ПЦР нужно будет оптимизировать для используемого прибора. Реакционную смесь инкубируют в течение 2 минут при температуре 50°С, 15 минут при температуре 95°С, затем 40 циклов по 15 секунд при температуре 94°С и минуту при температуре 60°С. Для каждого анализа, число пороговых циклов (число КТ) является числом циклов ПЦР, при котором флуоресценция реакции превышает 30 единиц флуоресценции.

iii) Анализ нуклеотидной последовательности

Некоторые гены вируса ИЛТ могут быть мишенями для ПЦР, с последующим анализом нуклеотидной последовательности результирующих ампликонов с целью идентификации штамма, например, ICP4 может быть амплифицирован с помощью ПЦР, с использованием праймеров, описанных Chacon и Ferreira (2009), и результирующих ампликонов, очищенных с использованием метода мини колонок, и представленных для дву¬направленного ДНК-секвенирования, с использованием ПЦР-праймеров в качестве праймеров для секвенирования. Для анализа последовательностей и сравнения с существующими последовательностями в GenBank можно использовать различные компьютерные программы, включая clustal W. Необходимо отметить, что для надлежащей идентификации штаммов вируса ИЛТ может понадобиться анализ последовательности многочисленных генов.

Полногеномное секвенирование также упоминалось в нескольких публикациях, как средство полной характеристики вирусных штаммов, но, по крайней мере, в настоящее время оборудование, реагенты и опыт доступны только в ограниченном числе лабораторий, и поэтому этот метод здесь не обсуждался.

iv) Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Комбинация ПЦР и ПДРФ позволила отличить полевые штаммы ИЛТВ от вакцинных штаммов (Creelan et al., 2006; Han & Sim, 2001; Kirkpatrick et al., 2006a; Ojkic et al., 2006; Oldoni Garcia, 2007). Был описан ряд рестрикционных эндонуклеаз (RE) для ПДРФ-анализа ПЦР-продуктов вируса ИЛТ, и несколько генов были мишенями для расщепления. К ним относятся: ICP4, TK, UL15, UL47 гликопротеин G, и ORF-BTK гены. Подробное описание методологии можно найти в работах Creelan с соавторами (2006), Han & Sim (2001), Kirkpatrick с соавторами (2006a), Ojkic с соавторами, (2006) и Oldoni и Garcia (2007). Краткое описание методологии для TK, ICP4, ICP18.5 и ORFB-TK с использованием ПЦР ПДРФ приведено ниже из работы Kirkpatrick с соавторами (2006a) с некоторыми изменениями.

Для амплификации TK, ПЦР проводят в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 200 мкм каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 1 мм MgCl 2, 250 мкм каждого праймера (прямой TK: CTG-GGC-TAA-ATC-ATC-CAA-GAC-ATC-A; и обратный TK: GCT-CTC-TCG-AGT-AAG-AAT-GAG-TAC-A), 1,25 мкл ДНК-полимеразы Taq, 5 мкл буфера для ДНК-полимеразы 10× Taq и 2 мкл экстрагированной ДНК. Реакционную смесь инкубируют при 94°C в течение 3 минут, затем подвергают 35 циклам при 94°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 45 секунд и 72°C в течение 60 секунд и, наконец, инкубируют при 72°C в течение 3 минут.

ПЦР-амплификацию ICP4, ICP18.5 и ORFB-TK проводят в отдельных пробирках с использованием праймеров: прямой ICP4: AAA-CCT-GTA-GAG-ACA-GTA-CCG-TGA-C и обратный ICP4:

ATT-ACT-ACG-TGA-CCT-ACA-TTG-AGC-C; прямой ICP18.5: TCG-CTT-GCA-AGG-TCT-TCT-GAT-GG и и обратный ICP18.5: AGA-TGT-TAA-TTC-ACA-CGG-ACA-C; и

прямой ORFB-TK: TCT-GCG-ATC-TTC-GCA-GTG-GTC-AG и обратный ORFB-TK: TGA-CGA-GGA-GAG-CGA-ACT-TTA-ATC-C. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержит по 200 мкл каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2 мМ MgSO4, по 250 мкл каждого праймера, 1 единцу Platinum Taq ДНК-полимеразы высокой точностью, 5 мкл 10 × буфер Platinum Taq ДНК-полимеразы и 2 мкл экстрагированной ДНК. Реакционную смесь инкубируют в течение 1 минуты при 94°С, затем подвергают 35 циклам в течение 1 минуты при 94°С, в течение 7 минут при температуре 68°С, и наконец инкубируют в течение 10 минут при температуре 68°С.

ПЦР-продукты TK, IСP4, IСP18.5 и ORFB-TK объемом по 10 мкл расщепляются отдельно при помощи рестрикционных эндонуклаз MspI, HaeIII, HaeIII и FokI соответственно, при температуре 37°С в течение 1 часа. После расщепления, полученные фрагменты ДНК разделяют в 15% полиакриламидном геле, и рестрикционные фрагменты ДНК визуализируют с использованием подходящего красителя нуклеиновых кислот и подвергают ультрафиолетовому излучению для визуализации. Разницы в паттерне записывают для каждого фермента и результаты можно оформить в виде древовидных схем.

# **6 Серологические тесты**

# **6.1 Общие положения**

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) является предпочтительным методом для выявления антител к вирусу ИЛТ в куриной сыворотке. Также можно использовать реакцию нейтрализации вируса (Adair et.al., 1985). В настоящее время иммунодиффузия в агаровом геле (AGID) и непрямая реакция иммунофлюоресценции мало используются.

# **6.2 Иммуноферментный анализ**

Ряд наборов ИФА имеются в продаже, и процедура анализа может изменяться в зависимости от набора; необходимо всегда следовать инструкциям производителя. В большинстве коммерческих ИФА, в качестве детектируемого антигена используется цельный вирус, но некоторые используют рекомбинантные гликопротеины. Для внутреннего ИФА, антиген всего вируса может быть получен путем соникации сильно инфицированных клеточных культур в момент максимальной ЦПЭ, которые затем центрифугируются, а супернатант переносится в лунки микротитровальных планшетов. Отрицательный антиген получают при помощи обработки незараженного материала культуры клеток аналогичным образом. Тест состоит главным образом в добавлении 0,1 мл тест-сыворотки в разведении 1/10 для дублирования лунок, покрытых положительным или отрицательным антигеном. После инкубации при 37°C в течение 2 часов, планшеты промывают четыре раза и добавляют кроличий антикуриный IgG, конъюгированный с пероксидазой, в рекомендуемом разведении (от 1/1000 до 1/4000 в зависимости от производителя). После инкубирования при 37°С в течение 1 часа, планшеты снова промывают 4 раза. Наконец, в каждую лунку добавляют хромаген, состоящий из 5-аминосалициловой кислоты, затем субстрат перекиси водорода до конечной концентрации 0,0005%, и считывают поглощение жидкости в каждой лунке при 450 нм на спектрофотометре. Результат для каждой сыворотки выражают в виде разницы между средней абсорбцией, полученной с положительными и отрицательными антигенами. Положительная/отрицательная пороговая точка разделения берется как среднее значение абсорбции для многочисленных отрицательных сывороток плюс 3 средних квадратических отклонения. Этот тест очень чувствителен и может быть полезен для целей наблюдения. Реакция антител, измеренная методом ИФА, обнаруживается через 7-10 дней после заражения и достигает максимума примерно через 2 недели. Реакция на вакцины против ИЛТ может быть различной, и тестирование часто проводится через 14 дней после вакцинации или после нее.

## **6.3 Нейтрализация вируса**

Тесты на нейтрализацию вируса можно проводить на отслоившихся хорион-аллантоисных оболочках оплодотворенных куриных яиц, которые инкубировали в течение 9-11 дней, где антитела специфически нейтрализуют образование вирусных поражений, обусловленных вирусом ИЛТ. Альтернативно, тесты можно проводить в клеточных культурах, где антитела специфически нейтрализуют вирус ИЛТ, таким образом, предотвращая развитие цитопатогенного эффекта. Удвоенные разведения сыворотки добавляются к равным объемам постоянной концентрации вируса. Эта концентрация может составлять либо 100 средних доз заражения яйцами (EID 50) для инокуляции яиц, либо 100 средних доз заражения тканевыми культурами (TCID 50) для инокуляции культур. Смеси инкубируют при 37°С в течение 1 часа для того чтобы произошла нейтрализация.

Когда проводится тест на яйцах, смеси вируса/сыворотки вводят в отслоившиеся хорион-аллантоисные оболочки с использованием, как минимум пяти яиц на разведение. Яйца запечатывают и инкубируют при температуре 37°C в течение 6-7 дней. Конечная точка регистрируется, как самое сильное разведение сыворотки, когда не имеется вирусных поражений на хорион-аллантоисных оболочках. Когда реакции проводятся на клеточных культурах, разведения сыворотки готовятся в 96-луночных планшетах для микрокультуры, и затем добавляется вирус. После периода времени, отведенного для нейтрализации, в каждую лунку добавляют свежеприготовленные клетки печени или почек куриного эмбриона. Планшеты инкубируют при 37°С в среде 5% СО2 и исследуют ежедневно на наличие цитопатогенного эффекта; 50% конечных точек считывают приблизительно через 4 дня, когда контрольный титр вируса указывает, что в реакции использовались ТЦД50 вируса, равные 30-300. Для метода тестирования, при помощи культуры клеток положительной считается нейтрализация вируса при 1/8 (начальное разведение) или выше.

# **7 Требования к вакцинам**

## **7.1 Характеристики посевного материала**

7.1.1 Биологические характеристики исходного вакцинного вируса

Вирусная посевная культура для аттенуированных живых вакцин ИЛТ представляет собой подходящий аттенуированный или естественно авирулентный штамм ИЛТВ. Аттенуация достигается при помощи серийного пассажа вируса в оплодотворенных яйцах или культурах тканей. Рекомбинантные векторные вакцины производят с использованием методологии рекомбинантных ДНК. Исходный вакцинный вирус (ИВВ) могут размножать в СПФ куриных эмбрионах или культурах тканей, полученных от данных эмбрионов. Первоначальные тесты проводятся для демонстрации безопасности и эффективности выбранного исходного вакцинного вируса, при этом исходный вакцинный вирус должен быть проверен на чистоту и идентичность вируса и наличие посторонних патогенов. Исходный вакцинный вирус хранят в аликвотах при -70°С. Вирусы, используемые при производстве, должны пройти не более 5 пассажей от исходного вакцинного вируса.

7.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних патогенов)

Следует регистрировать информацию о происхождении вирусного посевного материала, включая историю пассирования и любые манипуляции с генами. Исходный вакцинный вирус тестируют в куриных эмбрионах или цыплятах на стерильность и свободу от посторонних веществ (смотреть раздел 1.1.9). Содержание вируса определяют при помощи титрования вируса в куриных эмбрионах или культуре клеток.

7.1.3 Валидация в качестве вакцинного штамма

Вакцины против ИЛТ обеспечивают перекрестную защиту против различных штаммов вируса ИЛТ. Заражение нецелевых видов вакцинными штаммами вируса ИЛТ не является серьезной проблемой в связи с узким кругом хозяев вируса ИЛТ.

## **7.2 Метод производства**

7.2.1 Процедура

При массовом производстве вакцины, вирус размножают в СПФ куриных эмбрионах или культуре тканей, полученной от данных эмбрионов, не более чем в 5 пассажах от исходного вакцинного вируса. Подходящий уровень пассирования поддерживается экспериментально с использованием уровня пассирования, который применялся для приготовления экспериментального продукта, используемого в исследовании эффективности. Вакцину готовят путем введения производственного вакцинного вируса в 9-11 дневные куриные эмбрионы или культуру тканей, приготовленную из куриных эмбрионов, полученных из СПФ-стад. Яйца заражают через отверстие в скорлупе, в отслоившуюся хорион-аллантоисную оболочку или в аллантоисный мешок. Их запечатывают и инкубируют при 37°С в течение 4-6 дней. Все яйца проверяют просвечиванием до сбора вируса, и используют только яйца с живыми эмбрионами. Для сбора вируса яйца охлаждают, затем очищают и вскрывают в стерильных условиях. Хорион-аллантоисные оболочки или аллантоисные жидкости объединяют в пулы в стерильных охлажденных контейнерах. На хорион-аллантоисных оболочках должны иметься плотные серые бляшки, характерные для роста вируса ИЛТ. Продукт, полученный из культуры тканей, будет приготовлен из жидкостей культур клеток, несущих вирусы, которые также будут впоследствии объединены и протестированы.

7.2.2 Требования к ингредиентам

Сыворотка КРС, используемая при производстве вакцины, должна поставляться из страны с незначительным риском по трансмиссивной губкообразной энцефалопатии (ТГЭ). Следует учитывать происхождение панкреатического трипсина животного происхождения, используемого для культур клеток. Смотрите главу 1.1.8, в которой уделяется особое внимание продуктам биологического происхождения из страны с незначительным риском по ТГЭ.

7.2.3 Технологический контроль

Гомогенат зараженной ткани или тканевой культуры можно протестировать на чистоту, иммуногенность, содержание вируса и безопасность.

7.2.4 Испытания партии готового продукта

i) Стерильность

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

ii) Идентичность

Наличие вируса ИЛТ можно подтвердить при помощи смешивания вакцины с антисывороткой к вирусу ИЛТ и демонстрации того, что он более не способен инфицировать оплодотворенные куриные яйца от СПФ-стада, или восприимчивые линии клеток, которые инокулируют данным вирусом.

iii) Безопасность

Каждая партия вакцины вводится закапыванием в глаза (десять доз на птицу) или интратрахеально СПФ-цыплятам или другим целевым видам. Птиц обследуют в течение 14-21 дня на предмет побочных действий вакцины.

iv) Эффективность партии

Как только эффективность вакцины in vivo установлена, можно определить иммуногенность партии при помощи измерения содержания вируса. Это осуществляется при помощи титрования вируса с использованием серийных разведений вакцины, которые вводят в отслоившуюся хорион-аллантоисную оболочку оплодотворенных куриных яиц, или при помощи инокуляции подходящих клеточных культур. Содержание вируса (проверяемое в любое время периода истечения срока действия) должно быть равно или выше минимального титра, указанного на этикетке. Титры при выпуске и титры по истечению срока действия основаны на минимальной защитной дозе вакцины. Хотя тестирование эффективности каждой партии вакцины может и не понадобиться, может потребоваться тестирование эффективности репрезентативной партии (с использованием вакцинирующей дозы, содержащей титр, не превышающий минимального титра вируса, указанного на этикетке).

## **7.3 Требования к одобрению регулирующих органов**

7.3.1 Процесс производства

Для регистрации вакцины, органам власти должны быть представлены все соответствующие данные, касающиеся производства вакцины и тестирования контроля качества (смотреть разделы С.2.1 и С.2.2). Указанная информация должна быть представлена на основании трех следующих друг за другом партий вакцины объемом не менее 1/3 от обычного объема промышленной партии.

7.3.2 Требования к безопасности

Не допускается наличия характерных клинических признаков или смертельных случаев, вызванных ИЛТ.

i) Возврат к вирулентности

ЕС требует проведения пяти последовательных пассажей вакцинного вируса in vivo. Каждый пассаж проводят на группах из пяти СПФ-цыплят. Последовательный пассаж можно осуществить при помощи естественного распространения или при помощи отбора и объединения в пулы инфекционного материала из респираторного тракта от одной группы птиц и использования данного материала для заражения последующей группы птиц закапыванием в глаза. Пассированный вирус, полученный после пяти последовательных пассажей (или ранее если пассаж не получается поддерживать), сравнивают с непассированным вирусом с использованием индекса респираторной вирулентности. Максимально пассированный вирус не должен демонстрировать повышения вирулентности. Исследование индекса респираторной вирулентности включает интратрахеальное заражение 0,2 мл вакцины в трех различных дозах, начиная с исходной культуры с титром 105 инфицирующей дозы яиц или (EID50) или 105 средней инфекционной дозы для клеточной культуры (CCID50) на 0,2 мл (или максимальный полученный титр), и затем двумя серийными десятикратными разведениями данной исходной культуры. Как минимум 20 СПФ-цыплят было заражено одной дозой на каждую птицу. За цыплятами наблюдают в течение 10 дней, смертельные случаи регистрируются. Индекс респираторной вирулентности - это общее число смертей, наблюдаемых в трех группах, деленное на общее количество цыплят.

ii) Меры предосторожности (риски)

Следует соблюдать осторожность при разведении и введении вакцины и при правильной утилизации неиспользованной вакцины.

7.3.3 Требования к эффективности вакцины

Следует провести тестирование для установления эффективности вакцины для групп птиц минимального возраста, для которых предназначен препарат, а также для каждого вида птиц. Должен тестироваться каждый способ и метод введения, рекомендованный для вакцинации. Двадцать (США) или 30 (ЕС) цыплят вакцинируют вакцинным вирусом максимального уровня пассирования для аттенуации. Еще десять цыплят содержатся в качестве контрольных. Спустя 10-14 дней (США) или 21 день (ЕС) вакцинированных кур вместе с контрольными птицами подвергают контрольному заражению интратрахеально или в глазной синус вирулентным вирусом ИЛТ. Как минимум 80% (США) или 90% (ЕС) невакцинированных контрольных птиц должны умереть, или иметь тяжелые клинические признаки ИЛТ, или демонстрировать значительные макроскопические поражения. Удовлетворительным считается результат, когда только 5% или 10% вакцинированных птиц погибают или имеют тяжелые клинические признаки ИЛТ, или демонстрируют значительные макроскопические поражения.

7.3.4 Вакцины, позволяющие использовать стратегию DIVA (выявление инфекции у вакцинированных животных)

Изобретение рекомбинантных (векторных) вакцин против ИЛТ, позволило осуществлять серологическую дифференциацию инфицированных и вакцинированных птиц и позволило использовать контрольную стратегию DIVA. Многие вакцины против ИЛТ с делецией гена, которые находятся в процессе разработки, дают такие же возможности. В нескольких исследованиях сообщалось об использовании серологических методов скрининга для выявления антител против специфичных гликопротеинов вируса ИЛТ (Coppo и др., 2013).

7.3.5 Продолжительность иммунитета

Результаты вакцинации будут зависеть от многих факторов, включая режим дозирования и способ введения. Должна обеспечиваться некоторая степень защиты на протяжении нескольких месяцев.

7.3.6 Стабильность

Стабильность проверяют посредством регулярного отбора образцов правильно хранившейся вакцины и измерения содержания вируса. Тесты должны проводиться, как минимум на шести партиях вакцины или до тех пор, пока не будет оценено статистически допустимое количество серий, и должны продолжаться в течение 3 месяцев после установленного срока годности.

|  |
| --- |
| **МКС 11.220** |
|  |
| **Ключевые слова:** лабораторная диагностика инфекционного ларинготрахеита, птица сельскохозяйственная, болезни животных, идентификация возбудителя |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220** |
|  |
| **Ключевые слова:** лабораторная диагностика инфекционного ларинготрахеита, птица сельскохозяйственная, 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** |