Проект

Изображение государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

# Животные

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА

# 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 от «\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ года № \_\_\_\_.

**3** В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан   
«О ветеринарии» от 10 июля 2002 года № 339.

**4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 20\_\_ г.**

**ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет**

**5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

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

**Введение**

Японский энцефалит (ЯЭ) - это заболевание, вызываемое переносимым комарами флавивирусом, которое вызывает клинические признаки энцефалита у инфицированных людей и лошадей и может привести к летальному исходу (Феннер и и др., 1992; Хоук Джри Гинрих, 1994 г.; Мансфилд и др., 2017 г.). Однако инфекции у людей и лошадей обычно приводят к субклинической инфекции. У лошадей инфекция обычно протекает незаметно. У пораженных лошадей проявляются клинические признаки, которые включают лихорадку, депрессию, мышечную дрожь и атаксию (потеря координации движений). Вирус ЯЭ (JEV) также вызывает репродуктивную недостаточность у свиноматок, приводя к аборту, мертворождению или мумификации (высыханию) плода несмотря на то, что у инфицированных беременных свиноматок обычно не наблюдается клинических признаков, и инфекция не влияет на будущие беременности (Уильямс и др., 2012 г.).

JEV поддерживается в природе среди комаров, диких птиц и свиней (Оливейра и др., 2018 г.). Свиньи действуют как важные усилители вируса, и птицы также могут участвовать в его усилении и распространении. У свиней описана возможность беспереносной передачи (Риклин и др., 2016 г.). Основным переносчиком JEV является комар Culex tritaeniorhynchus в большинстве частей Азии. Другие комары culicine также играют роль переносчиков. Из-за низких титров и короткой продолжительности виремии люди и лошади не передают вирусы кусающим комарам и считаются тупиковыми хозяевами (организм, из которого инфекционный агент не передается другим чувствительным организмам). JEV широко распространен в странах восточной, юго-восточной и южной Азии и недавно распространился на западную Индию и западный регион Тихого океана, включая восточный Индонезийский архипелаг, Папуа-Новую Гвинею и Северную Австралию (Макензи и др., 2007 г.).

JEV относится к роду Flavivirus семейства Flaviviridae. JEV является типичным членом серокомплекса японского энцефалита, наряду с несколькими важными зоонозными вирусами, включая вирус Западного Нила, вирус энцефалита Сент-Луис и вирус энцефалита долины Мюррей. Был идентифицирован только один серотип JEV, несмотря на то, что антигенные и генетические различия между штаммами JEV были продемонстрированы несколькими методами, включая связывание комплемента, ингибирование гемагглютинации, испытания нейтрализации с использованием поликлональных или моноклональных антител (Али и Игараши, 1997 г.; Банержи, 1986 г.; Хейл и Ли, 1954 г.; Хасегава и др., 1994 г.; Кимура-Курода и Ясуи, 1986 г.) и олигонуклеотидные отпечатки вирусной (РНК) (Банержи и Ранадив, 1989 г.; Хори и др., 1986 г.). Было показано, что анализ гена оболочки (E) является хорошим представителем филогенетического анализа JEV. На сегодняшний день на основе филогенетического анализа вирусного гена E описано пять генотипов JEV (Щух и др.,   
2014 г.; Соломон и др., 2003 г.; Ючил и Сачиданандам, 2001 г.; Уильямс и др., 2000 г.).

Для выделения вируса берут материал головного мозга больных или павших лошадей, у которых проявляются клинические признаки энцефалита. Вирус может быть выделен в первичных клеточных культурах, полученных из куриных эмбрионов, клеток почек свиньи или хомяка, а также укоренившихся клеточных линий, таких как почки африканской зеленой обезьяны (Vero), почки детеныша хомячка (BHK-21) или клетки комара (C6/36). Идентификация вируса, выделенного в тканевых культурах, подтверждается серологическими методами или методами обнаружения нуклеиновых кислот, такими как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Анализ на антитела является полезным методом для определения распространенности инфекции в популяции лошадей, а также для диагностики японского энцефалита у больных людей. Методы анализа включают нейтрализацию вируса (VN), ингибирование гемагглютинации (HI), связывание комплемента (CF) и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Существует серологическая перекрестная реактивность с другими флавивирусами, такими как вирус Западного Нила, что может запутать диагноз. Испытание VN на уменьшение бляшек является наиболее специфичным и может использоваться для дифференциации инфекции JEV от других флавивирусных инфекций. Из-за перекрестной нейтрализации внутри серокомплекса японского энцефалита серологические исследования должны включать параллельно испытуемые родственные совместно распространяющиеся флавивирусы.

В нескольких странах Азии коммерчески доступны два типа вакцин для людей и животных. Для лошадей использовались инактивированные вакцины, приготовленные в клеточных культурах. Для свиней доступны инактивированные и живые аттенуированные вакцины.

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

**Основные положения**

**Дата введения**

# Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы лабораторной диагностики японского энцефалита.

**2 Методы диагностики**

**Таблица 1 - Методы испытаний, доступные для диагностики японского энцефалита и их цель**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Метод** | **Цель** | | | | | |
| Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельного животного до перемещения | Содействие политике искоренения | Подтверждение клинических случаев | Превалентность инфекции – надзор | Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации |
| **Обнаружение возбудителя1** | | | | | | |
| **Выделение вируса** | – | – | – | +++ | – | – |
| **Выявление антигена** | + | + | + | + | + | – |
| **ОТ-ПЦР в реальном времени** | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | – |
| **Обнаружение иммунной реакции** | | | | | | |
| **HI** | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| **CFT** | + | + | + | + | + | + |
| **ELISA** | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| **VN (PRNT)** | + | ++ | + | +++ | ++ | ++ |
| +++ = рекомендуется для этой цели;  ++ = рекомендуется, но имеет ограничения;  + = подходит в очень ограниченных случаях;  – = не подходит для этой цели.  ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;  HI = ингибирование гемагглютинации;  CFT = реакция связывания комплемента;  ELISA = твердофазный иммуноферментный анализ, ИФА;  VN = нейтрализация вируса;  PRNT: реакция нейтрализации бляшкобразования. | | | | | | |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1 Рекомендуется использовать комбинацию методов обнаружения возбудителя, применяемых к одному и тому же клиническому образцу

**Проект, редакция 1**

Окончательный диагноз ЯЭ у лошадей зависит от выделения или обнаружения возбудителя в неврологических образцах. Скорость выделения вируса от больных или павших лошадей обычно очень низкая, что может быть связано с нестабильностью вируса в определенных условиях окружающей среды, а также с наличием антител у инфицированных животных.

Клинические, серологические и патологические данные помогают в диагностике. Диагноз также возможен при обнаружении специфических антител IgM и IgG в спинномозговой жидкости методами твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (Бюрк и др., 1982 г.). Вирусная нуклеиновая кислота была обнаружена в головном мозге инфицированных лошадей с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (Лиан и др., 2002 г.; Лам и др., 2005 г.).

У лошадей образцы, собранные для выделения или обнаружения вируса (нуклеиновая кислота или антиген), представляют собой части полосатого тела (анатомическая структура конечного мозга), коры или таламуса (отдел головного мозга, представляющий собой большую массу серого вещества) головного мозга. Также можно использовать образцы крови и спинного мозга. У плодов, мертворожденных или новорожденных свиноматок вирус может быть выделен или обнаружен в тканях головного мозга, миндалин, селезенки, печени или плацентарной ткани. Все материалы должны быть помещены в холодильник сразу после сбора и заморожены до минус 80 °C, если образцы будут храниться более   
48 часов. Все лабораторные манипуляции с живыми культурами или потенциально инфицированным/контаминированным материалом должны выполняться с соблюдением соответствующего уровня биологической безопасности и локализации, определяемого анализом биориска, для предотвращения риска заражения человека. Человек может заразиться при прямом контакте инфекционного материала с поврежденной кожей или слизистыми оболочками, при случайном парентеральном введении или аэрозоле. Диагносты, собирающие образцы, также должны принимать соответствующие меры предосторожности. Вакцина для человека доступна, и полевые ветеринары и работники лабораторий должны быть вакцинированы.

**2.1 Обнаружение возбудителя**

Образцы тканей следует гомогенизировать в виде 10 % суспензии в буферном солевом растворе, рН 7,4, содержащей телячью сыворотку (2 %) или бычий сывороточный альбумин (0,75 %), стрептомицин (100 мкг/мл) и пенициллин (100 ед/мл). Сыворотка телят не должна содержать антител к JEV. Суспензию следует центрифугировать при 1500 g в течение   
15 минут и удалить надосадочную жидкость для испытания. Для выделения вируса в клеточной культуре можно использовать первичные культуры клеток куриного эмбриона, почки африканской зеленой мартышки (Vero), почки детеныша хомяка (BHK) или клеточную линию комара C6/36 (клонированную клеточную линию из Aedes albopictus). Гомогенаты образцов, таких как мозг и кровь, взятые у животных с подозрением на инфицирование, инокулируются на клеточные культуры. В отличие от клеток позвоночных, JEV обычно не вызывает цитопатического эффекта (CPE) в клетках C6/36. Следовательно, для подтверждения может потребоваться дальнейшее культивирование клеток позвоночных и/или обнаружение вирусного антигена или РНК. Моноклональные антитела, специфичные к флавивирусам и JEV, также можно использовать для идентификации вируса в фиксированных монослоях инфицированных клеток с помощью непрямого флуоресцентного испытания на антитела (Lian и др., 2002 г.).

Для обнаружения РНК вируса ЯЭ в клинических образцах, в клетках позвоночных, показывающих ЦПЭ, или в головном мозге инфицированных мышей также можно использовать ОТ-ПЦР с использованием соответствующих праймеров, специфичных для ЯЭ (Жан и др., 2000 г.; Лиан и др., 2002г.; Танака, 1993 г.; Уильямс и др., 2001 г.). Другие методы ОТ-ПЦР были описаны для диагностики человека несмотря на то, что опубликованных данных о методах обнаружения нуклеиновых кислот в ветеринарии мало.

**2.2 Серологические испытания**

Серологические испытания полезны для определения распространенности инфекции в популяции животных, географического распространения вируса и степени выработки антител у вакцинированных лошадей и свиней. Если предполагается использовать серологию для диагностики инфекций или заболеваний у домашних или диких животных, следует помнить, что в эндемичных районах может иметь место предшествующее заражение вирусом. При испытании лошадей и свиней следует также учитывать статус вакцинации при интерпретации положительных результатов серологии. Материнские антитела также могут сохраняться у свиней до 8 месяцев. Анализ на антитела является полезным методом для определения распространенности инфекции в популяции животных, а также для диагностики ЯЭ у больных лошадей или свиней. Методы анализа включают нейтрализацию вируса (VN), ингибирование гемагглютинации (ИГ), реакцию связывания комплемента (РСК) и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Диагноз требует значительного повышения титра антител в парных сыворотках, собранных во время острой фазы и фазы выздоровления (например, четырехкратное повышение титра VN). Следует также учитывать специфичность каждого серологического испытания. ИФА для антител к неструктурному белку (NS1) JEV можно использовать для дифференциации антител после естественной инфекции от антител, индуцированных инактивированными вакцинами.

В некоторых регионах мира необходимо провести дополнительные испытания на родственные вирусы, прежде чем можно будет поставить однозначный диагноз японского энцефалита. Например, в Австралии встречаются энцефалит долины Мюррей и вирус Западного Нила-Кунджин; эти вирусы являются членами серокомплекса JEV и антигенно тесно связаны с JEV. Недавнее распространение вируса Западного Нила в Северной Америке, где известно, что вирус энцефалита Сент-Луиса является эндемичным, еще раз иллюстрирует способность флавивирусов адаптироваться к новым условиям. Наличие антител к этим другим флавивирусам может затруднить серологическую диагностику японского энцефалита. Во всех испытаниях наблюдается некоторая перекрестная реактивность с другими флавивирусами; испытание VN на уменьшение бляшкообразования является наиболее специфичным, особенно если используется порог нейтрализации 90 %.

**2.3 Нейтрализация вируса (испытание нейтрализации уменьшения бляшкообразования)**

2.3.1 Клеточная культура

Клетки Vero, полученные из африканских зеленых мартышек (ATCC № CCL-81), рекомендуются для размножения вирусов и для использования в реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT).

Клетки Vero культивируются в полной альфа-минимальной поддерживающей среде (α-MEM), дополненной фетальной бычьей сывороткой (ФБС) и антибиотиками. Чтобы подготовить клетки для PRNT в 24-луночном формате, необходимо использовать следующий протокол:

i) Проверить, чтобы клетки Vero находились в логарифмической фазе   
(примерно 2 × 107 клеток в колбе 175 см2) с жизнеспособностью более 95 %.

ii) Добавить 1,0 × 104 клеток ~ 5 × 104 клеток в каждую лунку планшета; клетки выдерживают при 37 °C в инкубаторе с 5 % CO2 в течение 2 или 3 дней.

Слившийся монослой клеток следует приготовить за 2–3 дня до проведения анализа, поскольку монослой клеток имеет решающее значение для формирования бляшек и оценки точных результатов.

2.3.2 Штамм вируса и распространение

Для PRNT используется Штамм JEV (Накаяма, JaGar-01 или соответствующий штамм JEV).

Условия для приготовления вируса должны быть стандартизированы с использованием соответствующей множественности заражения (MOI: от 10–2 до 10–3).

2.3.3 Реагенты

i) α-MEM с добавлением 2–5 % ФБС и антибиотиков (100 ед/мл пенициллина,   
100 мкг/мл стрептомицина). Для PRNT следует использовать низкую конечную концентрацию ФБС в диапазоне от 2 % до 5 % для роста вирусов и клеток, а также для разбавления образцов.

ii) 4 % маточный раствор агарозы (растворенный в дистиллированной воде). Для приготовления верхнего слоя среды для образования бляшек обычно используются растворы агарозы с конечной концентрацией 1 % – 2 %.

iii) 0,1 % раствор нейтрального красного цвета. Чтобы визуализировать бляшку, в верхний слой среды добавляется жизненно важный краситель, такой как нейтральный красный. Нейтральный красный цитотоксичен при высоких концентрациях и чувствителен к свету, поэтому рекомендуется низкая концентрация красителя. Растворить нейтральный красный порошок в дистиллированной воде с концентрацией 0,1 % (масса/объем) и после автоклавирования хранить раствор в светонепроницаемом контейнере при 4 °C до использования.

2.3.4 Подготовка среды верхнего слоя

**Таблица 2 - Состав первого верхнего слоя среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Реагенты | Объем, мл |
| α-MEM содержащие антибиотики | 14 |
| FBS (5 % конечная концентрация) | 1 |
| 4 % агарозный исходный раствор | 5 |
| Общий объем | 20 |

**Таблица 3 - Состав второго верхнего слоя среды**

|  |  |
| --- | --- |
| Реагенты | Объем, мл |
| α-MEM содержащие антибиотики | 12,8 |
| FBS (5 % конечная концентрация) | 1 |
| 4 % агарозный исходный раствор | 5 |
| 0,1 % нейтральный красный раствор | 1,2 |
| Общий объем | 20 |

Объемы приведены в формате 24-луночного планшета. Смешать реагенты непосредственно перед использованием. Перед добавлением в лунки проверить, чтобы верхний слой среды поддерживалась при температуре 42 °C.

2.3.5 Анализ вирусного бляшкообразования

Для достижения точных измерений перед выполнением PRNT следует определить соответствующую дозу вируса для контрольного заражения. Следовательно, целевое количество бляшек можно определить с помощью анализа вирусных бляшек.

Для вирусов, принадлежащих к Flaviviridae, для этого анализа в основном используется метод двух наложений.

**2.4 Порядок проведения испытания (формат 24-луночного планшета)**

i) Подготовить слившиеся на 90 – 100 % клетки монослоя в 24-луночном планшете.

ii) Подготовить 7-логарифмическое серийное разведение (от 10–1 до 10–7) осветленного исходного раствора JEV в полной α-MEM (минимальная поддерживающая среда). Для этого последовательно развести 0,2 мл вирусного раствора в 1,8 мл среды в микропробирке.

iii) После маркировки планшетов удалить среду из каждой лунки и немедленно заменить ее 0,1 мл соответствующего разведения вируса. В качестве отрицательного контроля добавить полную среду без вируса.

iv) Инкубировать клетки с вирусом в течение 1 часа при 37 °C в инкубаторе с CO2.

v) После инкубации в течение 1 часа удалить среду, содержащую вирус, из лунок и заменить 0,5 мл первого верхнего слоя среды, содержащей агарозу.

vi) Дать агарозному покрытию затвердеть в течение 1 часа при комнатной температуре и инкубировать планшеты вверх дном, чтобы свести к минимуму конденсацию воды в лунках в инкубаторе при 37 °C в течение 48 часов, чтобы дать возможность развиться вирусным бляшкам.

vii) Добавить 0,5 мл второго верхнего слоя среды, содержащей 0,1 % нейтрального красного, в каждую лунку и дать агарозной оболочке затвердеть в течение 1 часа в светонепроницаемом инкубаторе.

viii) Инкубировать планшеты вверх дном в инкубаторе с CO2 при 37 °C в течение   
48 часов, чтобы дать возможность клеткам максимально окраситься.

ix) Подсчитать бляшки невооруженным глазом и рассчитать титр вирусного запаса. Титр можно рассчитать по следующей формуле.

Титр (бляшкообразующие единицы [БОЕ]/мл) = количество бляшек × коэффициент разбавления × 1 мл инокулята на лунку.

**2.5 Реакция нейтрализации бляшкобразования для антисыворотки вируса японского энцефалита**

2.5.1 Порядок проведения испытаний

i) Подготовить 90–100 % слившиеся клетки монослоя в 24-луночном формате.

ii) Подготовить серийные двукратные или четырехкратные разведения испытуемых сывороток и положительных и отрицательных контрольных сывороток. Испытуемые сыворотки должны быть инактивированы нагреванием при 56 °С в течение 30 минут перед проведением анализа. Все испытуемые сыворотки для анализа должны быть первоначально десятикратно разведены полной α-MEM перед приготовлением двукратных разбавителей.

Испытуемые группы, распределенные по типу сыворотки:

а) сыворотки крови невакцинированных свиней и лошадей;

b) сыворотки крови вакцинированных свиней и лошадей;

с) иммуноположительная свиная или лошадиная сыворотка против JEV;

d) отрицательная сыворотка: ФБС или иммуноотрицательная сыворотка свиней или лошадей против JEV.

iii) Подготовить 200 БОЕ/0,1 мл разведений вируса. Доза вирусных бляшек в растворителе должна быть предварительно определена с помощью анализа вирусных бляшек. Для сравнения также следует приготовить 20 БОЕ/0,1 мл разведения вируса (используется как пороговое значение титра вируса).

iv) Добавить равный объем разбавленной сыворотки к исходному раствору вируса, чтобы получить конечную концентрацию вируса примерно 100 БОЕ/0,2 мл. В случае разведения вируса 20 БОЕ/0,1 мл конечная концентрация штамма вируса будет составлять 10 БОЕ/0,2 мл.

v) Инкубировать планшет, содержащий смесь сыворотки и вируса, в течение 1 часа при 37 °C. После инкубации в кювету переносят 0,1 мл смеси.

vi) После инкубации в течение 1 часа удалить среду, содержащую вирус, из лунок и заменить 0,5 мл первого верхнего слоя среды, содержащей агарозу.

vii) Дать агарозному покрытию затвердеть в течение 1 часа при комнатной температуре и инкубировать планшеты вверх дном, чтобы свести к минимуму конденсацию воды в лунках, в инкубаторе с CO2 при 37 °C в течение 48 часов, чтобы дать возможность развиться вирусным бляшкам.

viii) Добавить 0,5 мл второго верхнего слоя среды, содержащей 0,1 % нейтрального красного, в каждую лунку и дать агарозной оболочке затвердеть в течение 1 часа в светонепроницаемом инкубаторе.

ix) Инкубировать планшеты вверх дном в инкубаторе с CO2 при 37 °C в течение   
48 часов, чтобы дать возможность клеткам максимально окрашиваться.

x) Подсчитать бляшки невооруженным глазом и рассчитать титр вирусного запаса.

xi) Рассчитать среднее количество бляшек в контрольных лунках без сыворотки и определить порог БОЕ при уровнях снижения 50 % и 90 %:

снижение 50 % = 0,5 × БОЕ/лунка (без сыворотки)

снижение 90 % = 0,1 × БОЕ/лунка (без сыворотки)

xii) Рассчитать конечный титр 50 % и 90 % для испытуемых сывороток, представляющий собой разведение сыворотки, наиболее близкое к уровню снижения, по отношению к среднему количеству бляшек в контрольных лунках без сыворотки.

**2.6 Ингибирование гемагглютинации**

Испытание ИГ широко используется для диагностики японского энцефалита, но имеет перекрестную реактивность с другими флавивирусами. Для настоящего испытания сыворотки должны быть сначала обработаны ацетоном или каолином, а затем адсорбированы гомотипными эритроцитами для удаления любых неспецифических гемагглютининов в испытуемых сыворотках. Эритроциты гусей или однодневных цыплят используются при оптимальном рН (см. таблицу ниже). Оптимальный рН зависит от используемого штамма JEV. Испытание следует проводить с обработанными сыворотками и 8 единицами стандартного антигена; это коммерчески доступно в некоторых странах.

2.6.1 Гемагглютинация (НА)

i) Получение вирусного антигена

1. Экстракция антигена сахарозой и ацетоном из инфицированного мозга мышат-сосунов:

а) Гомогенизировать инфицированный SMB с 4 объемами 8,5 % сахарозы.

b) Добавить по каплям гомогенат в 20-кратный объем холодного ацетона.

c) Центрифугировать (500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.

d) Ресуспендировать осадок в том же объеме холодного ацетона, упомянутого выше, и выдержать на бане со льдом в течение 1 часа.

e) Центрифугировать (500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.

f) Объединить осадок с холодным ацетоном в одну пробирку.

g) Центрифугировать (500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.

h) Распределить осадок внутри пробирки и высушить в вакууме в течение 1–2 часов.

i) Сухой осадок растворяется в физиологическом растворе: 0,4 объема исходного гомогената.

j) Центрифугировать (8000 g в течение 1 часа, 4 °C). Супернатант готов к использованию.

ii) Приготовление гусиных эритроцитов

1. Растворы

а) Кислый цитратный раствор на основе декстрозы (ACD)

11,26 г цитрата натрия (Na3C6H5O7.2H2O); 4,0 г лимонной кислоты (H3C6H5O7.H2O); 11,0 г декстрозы (C6H12O6); довести дистиллированной водой до конечного объема 500 мл. Автоклавировать при 10 фунтах (1,7 единицы давления) в течение 10 минут.

b) Декстроза-желатин-веронал (ДГВ)

0,58 г веронала (барбитала); 0,60 г желатина; 0,38 г натрия веронала (натрия барбитала); 0,02 г (0,026 г) CaCl2 (для CaCl2.2H2O); 0,12 г MgSO4.7H2O; 8,50 г NaCl; 10,0 г декстрозы; дистиллированной водой довести до конечного объема 1000 мл. Автоклавировать при 10 фунтах (1,7 единицы давления) в течение 10 минут (пятикратный объем запаса легче приготовить).

2. Сбор крови

1,5 мл АЦД + 8,5 мл крови (0,5 мл АЦД + 2,8 мл крови).

3. Промывка (стерильная)

а) Общая кровь + 2,5 объема ДГВ. Центрифугировать (500 g в течение 15 минут), затем удалить надосадочную жидкость.

b) Ресуспендировать осевшие эритроциты в трех объемах (общая кровь) DGV.

c) Центрифугировать (500 g в течение 15 минут), затем удалить надосадочную жидкость. Повторить шаги 2 и 3 еще дважды (всего четыре цикла отжима).

d) Перенести готовую суспензию эритроцитов в колбу с крышкой из алюминиевой фольги.

3. Регулировка концентрации RBC

а) 0,2 мл взвеси эритроцитов + 7,8 мл 0,9 % NaCl (разведение 1/40).

b) Измерить оптическую плотность (OD)490 на спектрофотометре с трубкой 10 мм.

c) Отрегулировать запас эритроцитов так, чтобы разведение 1/40   
выдавало 0,450 OD490. (Конечный объем = начальный объем × абсорбция OD490/0,450.)

d) Хранить запас эритроцитов в холодильнике до 1 недели.

е) Перед использованием аккуратно ресуспендировать эритроциты и развести 1/24 в разбавителе, регулирующем вирус (VAD).

iii) Разведение антигена

1. Исходные растворы (хранить при температуре 4 °С)

а) 1,5 М NaCl

87,7 г NaCl и дистиллированная вода для доведения до конечного объема 1000 мл.

b) 0,5 М борная кислота

30,92 г H3BO3 и горячая дистиллированная вода для доведения до конечного объема 700 мл (борная кислота растворяется и охлаждается).

c) 1 N NaOH

40,0 г NaOH и дистиллированной воды до конечного объема 1000 мл.

d) боратно-солевой раствор (БС), рН 9,0

80 мл 1,5 М NaCl, 100 мл 0,5 М H3BO3, 24 мл 1,0 N NaOH и дистиллированная вода для доведения до конечного объема 1000 мл.

e) 4 % бычьего альбумина

4 г бычьего альбумина, фракция V, 90 мл BS, pH 9,0, pH доводится до 9,0 с помощью 1N NaOH и BS, pH 9,0, чтобы получить конечный объем 1000 мл.

2. Растворитель антигена

0,4 % бычий альбумин/боратный солевой раствор (BABS): 10 мл 4 % бычьего альбумина, pH 9,0, и 90 мл BS, pH 9,0.

3. Серийное разведение

Двукратное серийное разведение антигена BABS на U-образном титрационном микропланшете.

iv) Добавление гусиных эритроцитов

1. Исходные растворы

1,5 М NaCl

0,5 М Na2HPO4: 70,99 г Na2HPO4 (для Na2HPO4, 12 H2O: 179,08 г) и дистиллированная вода для доведения до конечного объема 1000 мл.

1,0 М NaH2PO4: 138,01 г NaH2PO4·H2O (для NaH2PO4, 2H2O:156,01 г) и дистиллированная вода для доведения до конечного объема 1000 мл.

2. Рабочий раствор: разбавитель, регулирующий вирус (VAD)

**Таблица 4**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| VAD (pH) | 1,5 M NaCl | 0,5 M Na2HPO4 | 1,0 M NaH2PO4 |  |
| 6.0 | 100 | 32 | 184 | Добавить дистиллированную  воду к конечному  объему 1000 мм |
| 6.2 | 100 | 62 | 160 |
| 6.4 | 100 | 112 | 144 |
| 6.6 | 100 | 160 | 120 |
| 6.8 | 100 | 192 | 104 |
| 7.0 | 100 | 240 | 80 |

Значения VAD - это не pH каждого VAD, а pH после смешивания каждого VAD с равным объемом BABS, pH 9,0.

3. Процедуры

а) 1 объем исходных эритроцитов гуся + 23 объема VAD (разведение 1/24).

b) добавить по 25 мкл разведенных эритроцитов в каждую лунку титрационного микропланшета, содержащего разведенный антиген (25 мкл/лунка).

c) инкубировать при 37 °C в течение 30 минут, затем считать результат.

++ полная агглютинация (равномерно тонкая пленка эритроцитов, повторяющая кривизну дна лунки)

+ частичная агглютинация (кольцо, связанное с шероховатой или более тонкой пленкой)

± минимальная агглютинация (кнопка на тонкой или рассеянной пленке)

– отрицательная агглютинация (четко очерченная кнопка без пленки эритроцитов)

Конечной точкой является последнее разведение (самое высокое разведение), при котором наблюдается ++ или +.

Титр: величина, обратная конечной точке разведения.

2.6.2 Ингибирование гемагглютинации

i) Подготовка испытуемых сывороток

1. Сбор крови и разделение сыворотки

а) Инкубировать образец крови при 37 °C в течение 1 часа, а затем при 4 °C в течение ночи. Если испытание необходимо провести немедленно, инкубация образца в течение   
2–3 часов при 37 °C может заменить инкубацию в течение ночи.

b) Центрифугировать (2000 g в течение 15 минут) для отделения сыворотки от сгустка.

c) Инактивация нагреванием при 56 °C в течение 30 минут.

d) Хранить при минус 20 °C, если не перерабатывать сразу.

2. Лечение меркаптоэтанолом (выполнять этот шаг после определения титров антител IgM)

а) Поместить 50 мкл сыворотки в две маленькие пробирки.

b) В одну пробирку добавить 150 мкл 0,13 М 2-меркаптоэтанола в PBS, в   
другую – 15 мкл PBS.

c) Инкубировать при 37 °С в течение 1 часа, затем охладить на бане со льдом.

3. Экстрагирование ацетоном

а) К сыворотке в пробирку добавить 2,5 мл холодного ацетона. Закрыть резиновыми пробками, хорошо перемешать и экстрагировать в течение 5 минут на ледяной бане.

b) Центрифугировать на холоде (1500 g в течение 5 минут), затем удалить надосадочную жидкость.

c) Повторить шаги i и ii еще раз.

d) Распределить осадок по пробиркам и высушить в вакууме при комнатной температуре в течение 1 часа.

e) Добавить в каждую пробирку по 0,5 мл BS, pH 9,0. Применить резиновые пробки. Осадок растворять в течение ночи при 4 °C, чтобы получить 1/10 разведение сыворотки.

4. Экстрагирование каолином в качестве альтернативы экстрагированию ацетоном

а) 25 % промытый кислотой каолин в BS, рН 9,0.

b) 1 объем сыворотки + 4 объема BS + 5 объемов 25 % каолина.

c) Экстрагировать при комнатной температуре в течение 20 минут при периодическом встряхивании.

d) Центрифугировать (1000 g в течение 30 минут). Супернатант представляет собой разведение сыворотки 1/10.

5. Адсорбция гусиными эритроцитами

a) К каждой обработанной сыворотке добавить 1/50 объема упакованных гусиных эритроцитов.

b) Адсорбировать в течение 20 минут на ледяной бане.

c) Центрифугировать (800 g в течение 10 минут). Супернатант готов к испытанию HI (разведение 1/10).

ii) Реакция ингибирования гемагглютинации

1. Первичная титрация антигена гемагглютинацией

Разбавить антиген до 8 единиц/50 мкл.

2. Серийное двукратное разведение испытательной сыворотки на микро титровальном планшете

а) реакция сыворотка-антиген

Добавить по 25 мкл разведенного антигена в каждую лунку, содержащую разведенные испытуемые сыворотки. Поместить остаток антигена в пустые лунки и инкубировать при температуре 4 °С в течение ночи или 1 час при 37 °С.

3. Вторичная титрация антигена гемагглютинацией

а) Серийно развести приготовленный антиген (8 единиц/50 мкл) двукратно в системе на 25 мкл.

b) Добавить 25 мкл BABS в каждую лунку, чтобы получить 50 мкл/лунку.

4. Добавка гусиных эритроцитов

а) Разбавить исходный раствор эритроцитов (1/24) в VAD.

b) Распределить по 50 мкл в каждую лунку, содержащую 50 мкл смеси сывороточного антигена или вторичное титрование антигена.

c) Инкубировать при 37 °C в течение 30 минут, затем считать результат.

Титр HI в сыворотке: величина, обратная самому высокому разведению испытуемой сыворотки, показывающая полное ингибирование HA.

5. Интерпретация результатов

Четырехкратная разница между титрами в сыворотке остро больного и сыворотке выздоравливающих считается значительным повышением или понижением и является диагностическим признаком инфекции вирусом, антигенно родственным вирусу, использованному в испытании.

**2.7 Связывание комплемента**

Связывание комплемента (CF) иногда используется для серологической диагностики. Антиген для настоящего испытания экстрагируется ацетоном/эфиром из мозга инокулированных мышей.

2.7.1 Подготовка антигена

i) Извлечь и взвесить мозг инокулированных мертвых мышей.

ii) Добавить к мозгу 20 объемов холодного ацетона, выдержанного при температуре –20 °C, и гомогенизировать.

iii) Центрифугировать суспензию при 5000 g в течение 5 минут при 4 °C и удалить надосадочную жидкость.

iv) Добавить к осадку тот же объем холодного ацетона, что и на этапе ii выше, и хорошо перемешать.

v) Экстрагировать ацетоном, выдерживая осадок при минус 20 °C в течение 20 минут, и повторить центрифугирование, описанное в шаге iii выше.

vi) Повторить шаги iv и v.

vii) Повторить шаги iv и v, но на этот раз использовать холодный ацетон/эфир (смесь равного объема).

viii) Повторить шаги iv и v дважды, используя холодный эфир.

ix) Удалить супернатант аспиратором и распределить осадок по центрифужной пробирке.

x) Сушить пылесосом в течение 1 - 2 часов.

xi) Растворить осадок в холодном физиологическом растворе (2 мл/г мозга) и оставить на ночь при 4 °C.

xii) Центрифугировать при 5000 g в течение 1 часа. Супернатант представляет собой антиген.

2.7.2 Порядок проведения испытаний

i) Инактивировать нагреванием испытуемую сыворотку при разведении 1/4 в желатин-верональном буфере.

ii) Серийно развести сыворотку двукратно в 96-луночном титрационном микропланшете (25 мкл).

iii) Добавить 25 мкл 4 единицы антигена и перемешать вибрируя.

iv) Добавить 50 мкл 2 единицы комплемента (объединенная свежая сыворотка морской свинки).

v) Перемешать вибрируя и инкубировать при 4 °C в течение 18 часов.

vi) Оставить планшет для микротитрования при комнатной температуре на 15 минут.

vii) Добавить в каждую лунку по 25 мкл сенсибилизированных овечьих эритроцитов.

viii) Перемешать вибрацией и инкубировать при 37 °C в течение 30 минут, затем считать результат.

ix) Наибольшее разведение испытуемой сыворотки, показывающее отсутствие гемолиза, является титром сыворотки по испытанию на связывание комплемента (CF). Повышение или падение титра в четыре и более раз считается значительным.

**2.8 Иммунно-ферментный анализ**

Различные форматы ИФА использовались для обнаружения антител к японскому энцефалиту (JEV) у лошадей и свиней. Сообщалось об ИФА с блокировкой эпитопов с использованием моноклональных антител, специфичных к JEV, которые могут обнаруживать IgG у свиней (Пант и др., 2006 г.; Вильямс и др., 2001 г.) и лошадей (Лам и др., 2005 г.) несмотря на то, что антитела к близкородственным флавивирусам все еще могут перекрестно реагировать). Сообщалось об ИФА с захватом IgM для испытания сыворотки свиней (Пант и др., 2006 г.). Также был описан непрямой ИФА для изучения распространенности антител к JEV у свиней (Янг и др., 2006 г.). Настоящие анализы использовались для исследований распространенности серотипов и для диагностических исследований. Обычные серологические методы не могут отличить антитела, индуцированные природной инфекцией, от антител, индуцированных вакцинацией. Для обнаружения антител, индуцированных природными инфекциями, но не инактивированными вакцинами, был разработан метод ИФА, который выявляет антитела против неструктурного белка 1 (NS1) JEV, который индуцируется только инфекцией (Кониши и др., 2004 г.).

**3 Требования к вакцинам**

**3.1 Исходные сведения**

В нескольких странах Азии коммерчески доступны два типа вакцин для людей и животных. Для людей инактивированные вакцины, приготовленные из инфицированного мозга мышей, использовались в течение многих лет, но из соображений безопасности они были в значительной степени заменены живыми аттенуированными или инактивированными вакцинами, полученными из клеточных культур. Живая аттенуированная вакцина, выращенная в клетках почек хомяка, широко используется в Китае. Инактивированная вакцина, полученная из культуры клеток Vero, была лицензирована в 2009 году в нескольких странах. Рекомбинантная живая аттенуированная вакцина на основе вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки, содержащая структурные белки вируса желтой лихорадки, была лицензирована для использования в 2012 г. в Таиланде и Австралии.

Вакцину для профилактики японского энцефалита лошадей готовят путем инактивации формалином суспензии вируса, полученного из культур клеток. Для свиней применяют как инактивированные, так и живые аттенуированные вакцины, полученные из культур клеток.

Рекомендации, приведенные в данном разделе, носят общий характер и могут дополняться национальными и региональными требованиями.

**3.2 Обоснование и использование продукта по назначению**

Инактивированные вакцины использовались для защиты лошадей от энцефалита и возможной последующей смерти, вызванной инфекцией JEV. У свиней для защиты беременных свиноматок от мертворождения использовались как инактивированные, так и живые аттенуированные вакцины.

**3.3 Схема производства и минимальные требования к вакцинам**

3.3.1 Характеристики вакцинного материала

3.3.1.1 Биологические характеристики

Штаммы ЯЭ Пекин-1 и Накаяма использовались для производства инактивированных вакцин против ЯЭ для лошадей и свиней. Другие штаммы JEV также могут быть использованы. Штаммы Анянг 300 и ат222 использовались в качестве живых аттенуированных вакцин для свиней и лошадей. Вирусные штаммы инактивированных вакцин должны быть летальными для 3-недельных мышей в течение 14 дней при внутрибрюшинной инокуляции и должны быть способны расти в первичной культуре почек свиньи или в восприимчивых клеточных линиях. Используются SA-14-14-2, S-Анянг 300 и иногда другие штаммы JEV (Фугисаки и др., 1975 г.). Штамм вируса для живой аттенуированной вакцины должен быть летальным для 2- или 3-дневных мышей при интрацеребральной инокуляции, но не должно быть виремии при инокуляции 1-месячных поросят, и она не должна заражать плод при инокуляции супоросных свиноматок в течение первого месяца супоросности. Штаммы аттенуированных вакцин против ЯЭ также способны расти в первичной культуре почек свиньи или в восприимчивых клеточных линиях. Штаммы вакцины против ЯЭ обладают способностью гемагглютинировать эритроциты гусей, однодневных цыплят или голубей. Вирусы должны быть способны нейтрализоваться стандартной антисывороткой к JEV.

3.3.1.2 Критерии качества (стерильность, чистота отсутствие посторонних возбудителей)

Вакцинный вирус не должен содержать загрязняющих бактерий, грибков, микоплазм и вирусов. Испытания на стерильность и отсутствие контаминации биологических материалов, предназначенных для ветеринарного применения, приведены в [34].

3.3.1.3 Валидация в качестве штамма вакцины

Несмотря на то, что на основании анализа последовательности нуклеотидов существует пять генотипов JEV, и только один серотип JEV (Царев и др., 2000 г.; Уилс и др., 1992 г.). Вакцинный штамм JEV должен обладать генетическими и биологическими свойствами, указанными в 2.1.

3.3.1.4 Экстренная процедура предварительной приемки нового исходного вакцинного вируса (MSV) в случае эпизоотии

Если появляется новый штамм, антигенно отличающийся от существующих вакцинных штаммов, может возникнуть необходимость в разработке нового вакцинного штамма из репрезентативного полевого изолята. Прежде чем новый MSV может быть принят, должны быть продемонстрированы биологические характеристики MSV в соответствии с 3.3.1.

В экстренных ситуациях, когда недостаточно времени для завершения полного испытания MSV, предварительная приемка нового штамма должна основываться на анализе риска возможности контаминации антигеном. Такая оценка риска должна включать инактивацию антигена.

3.3.2 Метод производства

3.3.2.1 Порядок проведения

Вакцинный вирус инокулируется в восприимчивую клеточную культуру, а затем жидкости собираются отдельно из каждой партии, когда репликация вируса достигает своего максимума. Такая жидкость фильтруется или центрифугируется при 1500 g в течение 30 минут, а надосадочная жидкость обрабатывается как суспензия вируса.

Для инактивированной вакцины к суспензии добавляется формалин (0,2 %) или BEI (бинарный этиленимин, 0,05 М) для инактивации любого живого вируса; она считается «неразбавленной вирусной суспензией». Адъювант может быть добавлен для усиления его иммуногенности.

В случае живой аттенуированной вакцины жидкость, смешанная со стабилизатором, разливается во флаконы с вакциной и лиофилизируется.

Уровни пассажа вакцинного штамма не должны превышать на три больше, чем у исходного вируса, и на два больше, чем у вакцинного вируса. Рекомендуется хранить исходный и вакцинный вирусы при температуре ниже минус 70 °C или ниже 5 °C после лиофилизации.

3.3.2.2 Требования к ингредиентам

Формалин или BEI добавляется к суспензии вируса для инактивации вакцины. Время и температура инактивации должны быть подтверждены для демонстрации кинетики инактивации.

3.3.2.3 Внутрипроизводственный контроль

Вирусную суспензию следует исследовать на бактериальное и грибковое заражение культуральными методами и на инфекционность вируса путем инокуляции в клеточные культуры. Инактивированную неразбавленную суспензию вируса следует повторно исследовать на предмет контаминации культурой клеток и микроскопией после окрашивания, чтобы убедиться в полной инактивации вируса формалином или BEI.

3.3.2.4 Испытания партий конечного продукта

i) Стерильность (бесплодие)

Испытания на стерильность и отсутствие контаминации биологических материалов, предназначенных для ветеринарного использования согласно [34].

ii) Идентичность (абсолютное иммунологическое родство)

Конечный продукт живой аттенуированной вакцины против ЯЭ нейтрализуется в течение 1 часа путем смешивания с таким же количеством стандартной антисыворотки против ЯЭ. Смешанный раствор инокулируется в чувствительные клетки и наблюдается в течение 5 дней; клетки не должны проявлять цитопатического эффекта (ЦПЭ) или гемагглютинации в эритроцитах гуся.

iv) Активность партии

Инактивированная вакцина: Продукт разводят 1/10 в PBS. Тридцати мышам в возрасте 2–3 недель прививаются внутрибрюшинно по 0,1 мл разведенного продукта двукратно с интервалом в 3 дня. Должна быть эквивалентная контрольная группа без прививок. Десять мышей из каждой группы заражаются внутрибрюшинно десятикратными разведениями (1/10, 1/100 и 1/1000) соответствующего вируса, такого как штамм Накаяма, через 8 дней после первой инокуляции и наблюдаются в течение 14 дней. Выживаемость должна составлять более 40 % в иммунизированной группе, а уровень смертности в контрольной группе должен превышать 90 %. Титр контрольного вируса должен быть не менее 103 LD50 (50 % летальная доза) на 0,2 мл.

Живая аттенуированная вакцина для свиней: используются поросята в возрасте   
1 месяца, отрицательные по антителам к JEV. Одной дозой конечного продукта инокулируются трое поросят, а один поросенок используется в качестве контроля. За свиньями, используемыми для проверки активности, следует наблюдать в течение 3 недель, и они не должны иметь отклонений. Кровь свиней, используемая для испытания на эффективность, собирается через 3 недели и подвергается испытанию HI и PRNT. Титр HI и PRNT у свиней, инокулированных конечным продуктом, должен составлять более 1:20, а у контрольной свиньи - менее 1:10.

3.3.3 Требования к нормативному утверждению

3.3.3.1 Производственный процесс

Для регистрации вакцины все соответствующие подробности, касающиеся производства вакцины и контроля качества (см. 3.3.1 и 3.3.2), должны быть представлены на рассмотрение в компетентные органы. Настоящая информация должна быть предоставлена из трех последовательных серий вакцин объемом не менее 1/3 от объема типовой промышленной партии.

3.3.3.2 Требования к безопасности

У месячных поросят, привитых двумя дозами живой аттенуированной вакцины, не должно быть никаких клинических признаков, а плод не должен быть инфицирован при прививке беременных свиноматок той же дозой в первый месяц супоросности. Для инактивированной вакцины десяти 3-недельным мышам интрацеребрально инокулируют 0,03 мл продукта, и через 14 дней не должно наблюдаться их смертности.

i) Целевая и нецелевая безопасность животных

Живая аттенуированная вакцина для свиней должна быть безопасной для беременных свиней. Испытание на безопасность инактивированной вакцины проводится на 3-недельных мышах.

ii) Реверсия к вирулентности для аттенуированных/живых вакцин и экологические решения

Десяти 3-недельным мышам внутрибрюшинно прививают 0,3 мл дозы живой аттенуированной вакцины и наблюдают в течение 14 дней. Смертность мышей не должна превышать 20 %.

iii) Меры предосторожности (опасности)

Вакцина должна быть идентифицирована как безвредная или патогенная для вакцинаторов. Производители должны предоставить надлежащие предупреждения о том, что в случае самостоятельных инъекций (в том числе в отношении адъювантов, масляно-эмульсионных вакцин, консервантов и т. д.) следует обратиться за медицинской помощью, с предупреждениями, включенными в этикетку/вкладыш продукта, чтобы вакцинатор знал о любых опасностях. Лица, участвующие в производстве вакцин и вакцинации, должны быть привиты вакциной против ЯЭ для человека.

3.3.3.3 Требования к эффективности

Поскольку японский энцефалит (JEV) поддерживается среди комаров-переносчиков, свиней и диких птиц, контроль и ликвидация JEV с помощью вакцин затруднены. Вакцины используются для защиты лошадей от энцефалита и беременных свиноматок от мертворождений.

Сообщалось о методах испытания активности вакцины против JEV на животных. Необходимо проводить испытания эффективности как инактивированных, так и живых аттенуированных вакцин, в соответствии с перечислением iv) 3.3.2.4.

3.3.3.4 Метод распознавания аттенуированных штаммов вакцин против JEV от дикого JEV

Изолят вируса от инфицированных естественным путем или вакцинированных животных инокулируют 3-недельным мышам для подтверждения патогенности. Если более 20 % мышей, привитых внутрибрюшинно 0,3 мл, погибают, изолят считается патогенным. Кроме того, если поросята с дефицитом молозива в возрасте 3–5 дней подкожно инокулируют 1 мл изолята и у них развивается тяжелый энцефалит, это подтверждается как патогенный вирус ЯЭ. ПЦР и секвенирование также могут быть выполнены для подтверждения идентичности вирусного изолята путем сравнения с эталонным геном JEV или последовательностями геномов.

3.3.3.5 Продолжительность иммунитета

Иммунные реакции после вакцинации были исследованы и продолжаются более   
1 года. В рамках процедуры регистрации/лицензирования производитель должен продемонстрировать продолжительность иммунитета данной вакцины путем измерения нейтрализующих антител в конце заявленного периода защиты.

3.3.3.6 Стабильность

При хранении в рекомендуемых условиях конечный продукт должен сохранять свою активность в течение, по крайней мере, установленного срока годности продукта.

**Библиография**

[1] АЛИ А. и ИГАРАШИ А. (1997 г.). Антигенные и генетические вариации среди штаммов вируса японского энцефалита, относящихся к генотипу 1. Микробиол. Иммунол., 41, 241–252.

[2] БАНЕРДЖИ К. (1986 г.). Некоторые характеристики штаммов вируса японского энцефалита по испытанию нейтрализации. Индийский Дж. Мед. Рез., 83, 243–250.

[3] БАНЕРДЖИ К. и РАНАДИВ С. Н. (1989 г.). Олигонуклеотидный фингерпринт-анализ штаммов вируса японского энцефалита различного географического происхождения. Индийский Дж. Мед. рез., 89, 201–216 стр.

[4] БЕРК Д.С., ХИСАЛАК А. и УССЕРИ М.А. (1982). Японский энцефалит. В: Труды Международного семинара по вирусным заболеваниям в Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана, Макензи Дж. С., изд. Academic Press, Сидней, Австралия, стр. 537–540.

[5] КЛАРК Д. Х. И КАЗАЛС И. (1958 г.). Методы гемагглютинации с переносимыми членистоногими вирусами. Американский Журнал Троп. Мед. Гиг., 7, стр. 561–573.

[6] ФЕННЕР Ф.Дж., ГИББС Э.П.Дж., МЕРФИ Ф.А., РОТТ Р., СТУДДЕРТ М.Дж. и УАЙТ Д.О. (1992 г.). Флавивирусы. В: Ветеринарная вирусология, второе издание. Academic Press, Нью-Йорк, США, 441–455.

[7] ФУГИСАКИ Ю., СУГИМОРИ Т., МОРИМОТО Т. и МИУРА Ю. (1975 г.). Разработка аттенуированного штамма живой вакцины против японского энцефалита для свиней. Национальный инст. здоровья животных Q. (Япония), стр. 15–23.

[8] ХЕЙЛ Дж. Х. и ЛИ Л. Х. (1954 г.). Серологическое исследование шести вирусов энцефалита, выделенных в Малайе. Бр. ж. Эксп. Патол., 35, стр. 426–433.

[9] ХАСЭГАВА Х., ЁШИДА М., ФУДЖИТА С. и КОБАЯСИ Ю. (1994 г.). Сравнение структурных белков среди антигенно различных штаммов вируса японского энцефалита. Вакцина, 12, стр. 841–844.

[10] ХОК Ч.Х. Джуниор и Гингрич Дж. Б. (1994 г.). Японский энцефалит. В: Справочник по зоонозам, второе издание, Беран Г.В., изд. CRC Press, Бока-Ратон, Флорида, США, стр. 59–69.

[11] ХОРИ Х., МОРИТА К. и ИГАРАШИ А. (1986 г.). Анализ олигонуклеотидных отпечатков пальцев штаммов вируса японского энцефалита, выделенных в Японии и Таиланде. Acta Virol., 30, стр. 353–359.

[12] ЯН Л.Р., ЮЕХ И.И., ВУ И.С., ХОРНГ С.Б., и ЯНГ Г.П. (2000 г.). Генетическая вариация вируса японского энцефалита на Тайване. Американский журнал Троп. Мед. Гиг., 62, стр. 446–452.

[13] КИМУРА-КУРОДА Дж. И ЯСУИ К. (1986 г.). Антигенное сравнение оболочечного белка Е вируса японского энцефалита и некоторых других флавивирусов с использованием моноклональных антител. Журн. Ген. Вирусол., 67, стр. 2663–2672.

[14] КОНИСИ Э., ШОДА М., АДЖИРО Н. и КОНДО Т. (2004 г.). Разработка и оценка твердофазного иммуноферментного анализа для количественного определения антител к неструктурному белку 1 вируса японского энцефалита для выявления субклинических инфекций у вакцинированных лошадей. Журн. Клин. Микробиология, 42, стр. 5087–5093.

[15] ЛАМ К.Х.К., ЭЛЛИС Т.М., УИЛЬЯМС Д.Т., ЛУНТ Р.А., ДЭНИЭЛС П.В., Уоткинс К.Л. и РИГГС К.М. (2005 г.). Японский энцефалит у скакуна чистокровного мерина в Гонконге. Вет. Рек., 157, 168.

[16] ЛИАН В.К., ЛИАУ М.Ю. и МАО С.Л. (2002 г.). Диагностика и генетический анализ вируса японского энцефалита, инфицированного у лошадей. Журн. Вет. Мед. Б Инфекц. Болезни. Вет. Общественное здравоохранение, 49, стр. 361–365.

[17] МАККЕНЗИ Д.С., УИЛЬЯМС Д.Т. и СМИТ Д.У. (2007 г.). Вирус японского энцефалита: географическое распространение, заболеваемость и распространение вируса со склонностью к появлению в новых районах. В: Перспективы медицинской вирусологии: новые вирусы в человеческой популяции, Табор Э., изд. Эльсевьер, Амстердам, Нидерланды, стр. 201–268.

[18] МАНСФИЛД К.Л., ХЕРНАНДЕЗ-ТРИАНА Л.М., БАНИЯРД A.C., ФУКС А.Р. и ДЖОНСОН Н. (2017 г.). Заражение вирусом японского энцефалита, диагностика и борьба с домашними животными. Вет. Микробиология, 201, 85–92.

[19] ОЛИВЕЙРА А.Р., СТРАТЕ Э., ЭТЧЕВЕРРИ Л., КОНШТАДТ Л.В., МАКВЕЙ Д.С., ПЬЯДЖИО Дж. И ЧЕРНИККЬЯРО Н. (2018 г.). Оценка данных о компетентности переносчика и хозяина в отношении вируса японского энцефалита: систематический обзор литературы. Пред. Вет. мед., 154, 71–89.

[20] ПАНТ Г.Р., ЛУНТ Р.А., РУТС К.Л. И ДЭНИЭЛС П.У. (2006 г.). Серологические данные о японском энцефалите и вирусах Западного Нила у домашних животных в Непале. Комп. Иммунол. микробиол. Инфекц. Дис., 29, стр. 166–175.

[21] ПАРИДА М. М., САНТОШ С. Р., ДАШ П. К., ТРИПАТИ Н. К., САКСЕНА П., АМБУДЖ К. САХНИ А. К., ЛАКШМАНА РАО П. В. и МОРИТА К. (2006 г.). Разработка и оценка метода изотермической амплификации, опосредованного петлей обратной транскрипции, для быстрого обнаружения вируса японского энцефалита в режиме реального времени. Дж. Клин. Микробиология, 44, 4172–4178.

[22] РИКЛИН М.Е., ГАРСИЯ-НИКОЛАС О., БРЕХБЮЛЬ Д., ПИТОН С., ЗУМКЕР Б., НУГАЙРЕДЕ А., ЧАРРЕЛ Р.Н., ПОСТХАУС Х., ОВЕРМАНН А. и САММЕРФИЛД А. (2016 г.). Беспереносная передача и персистенция вируса японского энцефалита у свиней. Нац. коммун., 7, 10832.

[23] ШУХ А.Дж., УОРД М.Дж., ЛИ БРАУН А.Дж. и БАРРЕТТ А.Д. (2014 г.). Динамика появления и закрепления нового доминирующего генотипа вируса японского энцефалита по всей Азии. Журн. Вирусол., 88, стр. 4522–4532.

[24] СОЛОМОН Т., Н.И. Х., БИЗЛИ Д.В.К., ЭККЕЛЕНКАМП М., КАРДОЗА М.Дж. и Барретт А.Д.Т. (2003 г.). Происхождение и эволюция вируса японского энцефалита в Юго-Восточной Азии. Журн. Вирусол., 77, 3091–3098.

[25] ТАНАКА М. (1993). Экспресс-идентификация флавивирусов с помощью полимеразной цепной реакции. Дж. Вирол. Методы, 41, 311–322.

[26] ЦАРЕВ С.А., САНДЕРС М.Л., ВОН Д.У. и ИННИС Б.Л. (2000 г.). Филогенетический анализ предполагает только один серотип вируса японского энцефалита. Вакцина (Приложение 2), 36–43.

[27] УЧИЛ П.Д. и САТЧИДАНАНДАМ В. (2001 г.). Филогенетический анализ вируса японского энцефалита: анализ на основе оболочечных генов выявляет пятый генотип, географическую кластеризацию и множественные интродукции вируса на Индийский субконтинент. Американ. Журн. Троп. Мед. Гиг., 65, 242–251.

[28] УИЛЬЯМС Д.Т., ВАНГ Л.Ф. ДЭНИЭЛС П.Д. и МАККЕНЗИ Дж.С. (2000 г.). Молекулярная характеристика первого австралийского изолята вируса японского энцефалита, штамма FU. Журн. Ген. Вирусол., 65, стр. 2471–2480.

[29] УИЛЬЯМС Д.Т., ДЭНИЭЛС П.В., ЛУНТ Р.А., ВАНГ Л.Ф., НЬЮБЕРРИ К.М. и МАККЕНЗИ Дж.С. (2001 г.). Экспериментальное заражение свиней вирусом японского энцефалита и близкородственными австралийскими флавивирусами. Американ. Журн. Троп. Мед. Гиг., 65 (4), 379–387.

[30] УИЛЬЯМС Д.Т., МАККЕНЗИ Д.С. И ДЭНИЭЛС П.У. (2012 г.). Флавивирусы. В: Болезни свиней, 10-е издание, Циммерман Дж. Дж., Каррикер Л., Рамирес А., Шварц К. и Стивенсон Г., под ред. Уайли-Блэквелл, Эймс, Айова, США, стр. 528–537.

[31] УИЛЛС М.Р. СИЛ Б.К., КАО Дж.Х., Ю.Ю.X. и БАРРЕТТ А.Д. (1992 г.). Антигенная характеристика живого аттенуированного вакцинного вируса японского энцефалита SA14-14-2: сравнение с изолятами вируса, охватывающими широкий географический район. Вакцина, 10, стр. 861–872.

[32] ШИНЛИН Дж., ХУАНЧУН C., КИГАЙ Х., ШИЯНГ В., БИН В., ДЕКСИН К. и ЛИУРОНГ Ф. (2002 г.) Разработка и применение испытаний латексной агглютинации для обнаружения сывороточных антител против вируса японского энцефалита. Вет. Рез. Комм., 26, стр. 495–503.

[33] ЯН Д.К., КИМ Б.Х., ЛИМ С.И., КВОН Дж.Х., ЛИ К.В., ЧОЙ К.У. и КВЕОН С. (2006). Разработка и оценка непрямого ИФА для обнаружения антител против японского энцефалита у свиней. Журн. Вет. наука, 7, стр. 271–275.

[34] Рекомендации Всемирной организации здравоохранения животных Международного эпизоотического бюро (МЭБ) «Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных», глава 1.1.9.

Примечание - Существует Справочная лаборатория МЭБ по японскому энцефалиту (просим посетить веб-сайт МЭБ: https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3). Просим связаться со Справочной лабораторией МЭБ для получения дополнительной информации о диагностических испытаниях, реагентах и вакцинах против японского энцефалита.

**МКС 11.220**

**Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, японский энцефалит, методы испытаний

**МКС 11.220**

**Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, японский энцефалит, методы испытаний

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** |
| **Специалист**  **Департамента разработки НТД** |  | **Ж. Туяков** |