Изображение Государственного Герба Республики Казахстан

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ**

**Основные положения**

**СТ РК**

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения*

**Комитет технического регулирования и метрологии**

**Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан**

**(Госстандарт)**

**Астана**

**Предисловие**

**1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**3**Настоящий стандарт разработан с учетом требований   
Руководства Международного эпизоотического бюро (МЭБ) Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ) по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных

**4**В настоящем стандарте реализованы нормы Приказа Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 июня 2014 года №16-07/332, «Об утверждении Правил планирования и проведения ветеринарных мероприятий против особо опасных болезней животных», зарегистрированного в Министерстве юстиции Республики Казахстан 29 июля 2014 года № 9639

**5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

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

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан.

**Предисловие**

Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (Руководство по наземным животным) призвано предотвращать и контролировать болезни животных, включая зоонозы, способствовать совершенствованию ветеринарных служб по всему миру, а также обеспечивать безопасную международную торговлю животными и продуктами животноводства. Основная целевая аудитория – лаборатории, проводящие ветеринарные диагностические тесты и надзор, плюс производители и потребители вакцин и регламентирующие органы стран-членов. Основная цель – предоставить согласованные на международном уровне методы и требования лабораторной диагностики для производства и контроля соответствующих вакцин и прочих биологических продуктов.

Эта амбициозная задача потребовала объединения широко известных ветеринарных специалистов из многих стран. МЭБ, Всемирная организация по охране здоровья животных, получила от стран-членов МЭБ мандат на решение этой задачи на глобальном уровне. Основными видами деятельности этой организации, учрежденной в 1924 году и объединившей к 2016 году 180 стран и территорий, являются следующие:

1. Обеспечить транспарентность глобальной ситуации по болезням животным и зоонозам.

2. Собирать, анализировать и распространять научную ветеринарную информацию о методах контроля болезней животных.

3. Предоставлять заключения специалистов и способствовать международной солидарности при контроле болезней животных.

4. Защищать мировую торговлю посредством опубликования санитарных стандартов для международной торговли животными и продуктами животноводства в рамках полномочий, предусмотренных в Соглашении ВТО (Всемирная организация торговли) о применении санитарных и фитосанитарных мер (СФС Соглашение).

5. Усовершенствовать законодательные рамки и ресурсы национальных ветеринарных служб.

6. Обеспечивать более высокие гарантии безопасности продуктов животного происхождения, а также способствовать благополучию животных посредством научно-обоснованных подходов.

Руководство по наземным животным, охватывающее инфекционные и паразитарные болезни млекопитающих, птиц и пчел, было впервые опубликовано в 1989 году. В каждой последующей редакции предоставляемая информация расширялась и усовершенствовалась: в Части 1 содержится вводная глава, в которой установлены общие стандарты контроля ветеринарных диагностических лабораторий и объектов по производству вакцин; в Части 2 объединены специальные рекомендации, и она включает восемь новых глав о рекомендациях в отношении валидации диагностических тестов и три новых главы о рекомендация по производству вакцин; в Части 3 объединены главы по болезням списка МЭБ и другим значимым болезням; и Часть 4 – список референтных центров на момент публикации (Список референтных центров обновляется Всемирной ассамблеей делегатов (стран-членов МЭБ) каждый год; пересмотренный список представлен на сайте МЭБ).

В качестве дополнительного тома к Ветеринарно-санитарному кодексу по наземным животным, Наземное руководство устанавливает лабораторные стандарты по всем болезням списка МЭБ, а также по нескольким другим болезням мирового значения. В нем описаны применимые диагностические тесты, включая тесты, которые подходят для сертификации отдельных животных перед перемещением. Наземное руководство стало широко распространено в качестве ключевого справочника для ветеринарных лабораторий по всему миру. Болезни водных животных включены в отдельное Руководство по водным животным.

Всемирная ассамблея национальных делегатов возложила задачу по подготовке глав и компоновке Наземного руководства на Комиссию МЭБ по биологическим стандартам. Рукописи были запрошены от специалистов (назначенные МЭБ эксперты в референтных лабораториях МЭБ, если целесообразно) по каждой болезни или по другим рассматриваемым темам. Иногда собирали специальные группы экспертов, которым давали задание актуализировать или разработать статью. После первоначального изучения техническим редактором-консультантом Комиссия по биологическим стандартам направляла главы в страны-члены МЭБ для изучения и комментариев. Прежде чем закончить главы и во второй раз направить их во все страны-члены Комиссия, избираемая на Ассамблее каждые три года, в сотрудничестве с техническим редактором-консультантом, рассмотрели все итоговые комментарии, зачастую обращаясь к авторам за дополнительной помощью. Затем итоговый текст представляли для утверждения Ассамблеей на Генеральной сессии, которая проводится в мае каждого года.

Процедура официального признания коммерческих диагностических тестов под руководством Ассамблеи была закончена в сентябре 2004 года. Данные представлены с использованием модели валидации, которая разработана Комиссией по биологическим стандартам. Предоставленные данные оценивают назначенные эксперты, которые дают рекомендации Комиссии по биологическим стандартам до обращения во Всемирную Ассамблею МЭБ для получения итогового заключения. Всю информация о подаче заявок можно получить на сайте МЭБ. <https://rr-europe.woah.org/ru>

**Введение**

Туляремия - зоонозная инфекция, вызываемая Francisella tularensis. В природе она встречается у зайцеобразных (кролики и зайцы), и у грызунов, особенно у семейства полевковых (полевки, водяные крысы и ондатры) и у бобров. Также сообщалось об инфицировании многих видов других млекопитающих, птиц, земноводных и беспозвоночных. Туляремия имеет эндемическое распространение в Северном полушарии. Эпизоотические вспышки болезни могут происходить во многих странах в Северной Америке и Европе, в то время как в некоторых других странах Европы и Азии происходят только спорадические случаи болезни. Данная болезнь редко регистрируется в тропиках или в Южном полушарии.

Признаны два наиболее значимых с клинической точки зрения типа Francisella tularensis на основе характеристик культур, эпидемиологии и вирулентности. Tularensis (Тип А), подвид Francisella tularensis, ассоциируется главным образом с зайцеобразными в Северной Америке. Он передается главным образом клещами или жалящими мухами, или при прямом контакте с зараженными зайцеобразными. Он является высоковирулентным для человека и домашних кроликов, большинство изолятов ферментируют глицерин. Holarctica (Тип В), подвид Francisella tularensis, главным образом встречается у водных грызунов (бобры, ондатры) и у полевок в Северной Америке, и у зайцеобразных (зайцев) и грызунов в Евразии. Он передается главным образом при прямом контакте или посредством членистоногих (главным образом клещей и комаров), но может передаваться аспирационным путем или через зараженную воду или продукты. Он является менее вирулентным для человека и домашних кроликов, и не ферментирует глицерин.

У чувствительных животных наблюдаются признаки тяжелого угнетения с последующей смертельной септицемией. Течение болезни составляет приблизительно 2-10 дней у чувствительных видов, и животные обычно мертвы, когда их передают на диагностику. У большинства домашних видов обычно не проявляются признаки туляремии, но у них вырабатываются специфичные антитела к данному организму после заражения. Вспышки с высокой смертностью, вызванные организмом Типа А, происходили среди овец. Среди домашних животных сообщалось, что кошки могут выступать в качестве переносчика бактерии и болезнь порой передается от кошек человеку.

Аутопсия показала, что животные, которые умерли от острой туляремии, обычно находятся в хорошем физическом состоянии. Имеются признаки септицемии, которые характеризуются белыми очагами некроза, неравномерно распределенными в печени, костном мозгу и селезенке. В дополнение к этому, селезенка обычно увеличена. Очаги некроза различаются в размере, и в некоторых случаях они едва различимы невооруженным глазом. Обычно наблюдается застой и отек в легких, также могут присутствовать уплотнения в легких и фибринозная пневмония или плеврит. Фибрин может присутствовать в брюшной полости. Очаги казеозного некроза часто присутствуют в одном или нескольких лимфатических узлах. Поражаются чаще всего лимфатические узлы, которые находятся в брюшной и плевральной полости, а также лимфатические узлы, дренирующие конечности. У менее чувствительных видов макроскопическая картина может напоминать туберкулез с гранулемами в подострой или хронической форме в легких, околосердечной сумке, почках, селезенке и печени. Макрофаги являются главными клетками, образующими гранулемы, но также иногда обнаруживают другие клетки, включая лимфоциты, гетерофильные гранулоциты, многоядерные гигантские клетки и фиброциты. Точечный или мультифокальный некроз часто наблюдается в центре этих поражений.

Существует высокий риск заражения человека F. tularensis, так как инфицирующая доза чрезвычайно мала и зараженные животные выделяют бактерии с мочой и фекалиями. Заражение может произойти при простом контакте. Следует принимать надлежащие меры безопасности, такие как ношение перчаток, масок и защитных очков во время работы с патологическими образцами или культурами во избежание заражения людей. Все лабораторные манипуляции с живыми культурами или потенциально зараженным или контаминированным материалом должны проводиться в соответствии с надлежащим уровнем биобезопасности и биозащиты, который определен в анализе биорисков (см. Глава 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарных лабораториях и вивариях). Страны, у которых нет доступа к специализированной национальной или региональной лаборатории, должны отправлять образцы в Справочную лабораторию МЭБ. Экспериментально зараженные животные и их испражнения представляют особую опасность для человека.

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**Животные**

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ**

**Основные положения**

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

**1 Область применения**

Настоящий стандарт содержит основные положения по определению лабораторной диагностики заболевания животных туляремией, а также устанавливает требования к лабораторной диагностике туляремии.

Настоящий стандарт распространяется на животных зайцеобразных, грызунов и многих видов млекопитающих и нескольких видов птиц, а также членистоногих, питающихся кровью, играющих важную роль в передаче заболевания туляремии.

Стандарт применяют при диагностировании заболевания животных туляремией в лабораториях ветеринарных научно-исследовательских учреждений.

**2 Термины и определения**

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями:

**Анализ биологического риска**:Процесс, включающий в себя идентификацию биологической опасности, оценку биологического риска, управление биологическим риском и информирование о биологическим риске.

**Атаксия:** Расстройство координации движений. Сила в конечностях незначительно снижена или сохранена полностью.

**Альфавирусы:** Род [РНК-вирусов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%9D%D0%9A-%D1%81%D0%BE%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%B6%D0%B0%D1%89%D0%B8%D0%B5_%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B" \o "РНК-содержащие вирусы), единственный род в семействе Togaviridae. Альфавирусы принадлежат к группе IV [Балтиморской классификации](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%BE%D0%B2_%D0%BF%D0%BE_%D0%91%D0%B0%D0%BB%D1%82%D0%B8%D0%BC%D0%BE%D1%80%D1%83" \o "Классификация вирусов по Балтимору) [вирусов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B) с [одноцепочечным](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%9E%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%86%D0%B5%D0%BF%D0%BE%D1%87%D0%B5%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%A0%D0%9D%D0%9A-%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B_%D1%81_%D0%BF%D0%BE%D0%B7%D0%B8%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%BE%D0%B9_%D1%86%D0%B5%D0%BF%D1%8C%D1%8E&action=edit&redlink=1) геномом (+) [РНК](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0). Существует 32 альфавируса, которые заражают различных [позвоночных](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%B7%D0%B2%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5), таких как люди, грызуны, рыбы, птицы и более крупных млекопитающих, таких как лошади, а также [беспозвоночных](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D1%81%D0%BF%D0%BE%D0%B7%D0%B2%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B5).

**Биологическая опасность (адаптировано из CWA 15793:2011):** Потенциальный источник вредного воздействия, оказываемого биологическими агентами и токсинами.

Примечание – CWA, Соглашение Рабочей группы CEN (2011).

**Биологический агент (адаптировано из CWA 15793:2011):** Все микроорганизмы, в том числе генетически модифицированные организмы, клеточные культуры и паразиты, которые способны вызывать инфекцию, аллергическую или токсическую реакцию у людей, животных или растений.

Примечание - В целях Анализа Биорисков прионы считаются биологическим агентами.

**Биобезопасность:** Лабораторная биобезопасность описывает принципы и практические методы, направленные на предупреждение непреднамеренных контактов с биологическими материалами или их случайной утечки.

**Биозащита:** Лабораторная биозащита описывает контроль биологических материалов в лабораториях с целью предупреждения их утери, кражи, неправильного использования, несанкционированного доступа или преднамеренной несанкционированной утечки.

**Биориск (адаптировано из CWA 15793:2011):** Сочетание вероятности возникновения и тяжести вредного воздействия, если источником такого воздействия является биологический агент или токсин.

Примечание: Источником вредного воздействия может быть непреднамеренное воздействие, случайная утечка или утеря, кража, ненадлежащее использование, диверсия, несанкционированный доступ или преднамеренная несанкционированная утечка.

**Безопасность:** Отсутствие свойств, вызывающих ненадлежащие местные или системные реакции при использовании в соответствии с рекомендациями или инструкциями производителя и без известного риска для контактирующих животных, людей или окружающей среды.

**Вакцина:** Включает все продукты, разработанные для стимуляции активной иммунизации животных от болезни безотносительно типа микроорганизма или микробного компонента или токсина, из которого они могут быть получены, или который они могут содержать.

**Валидация:** Процесс, определяющий соответствие целевому назначению анализа, который надлежащим образом разработан, оптимизирован и стандартизирован.

**Внутренние проверки:** Все мероприятия по обеспечению качества в рамках лаборатории, связанные непосредственно с мониторингом, валидацией и поддержанием рабочих характеристик анализа и технической профессиональной подготовки.

**Воспроизводимость:** Способность метода тестирования обеспечивать достоверные результаты в отношении аликвот одной и той же пробы, протестированной одним и тем же методом в разных лабораториях.

**Гармонизация:** Результат соглашения между лабораториями для калибровки похожих методов тестирования, корректировки пороговых значений диагностических методов и выражения данных тестирования способом, обеспечивающим единообразную интерпретацию результатов между лабораториями.

**Готовый продукт (партия):** Все запечатанные готовые контейнеры, в которые фасовали одну однородную партию вакцины в ходе одной рабочей смены, лиофилизированные в ходе одной непрерывной процедуры (если применимо), укупоренные во время одной рабочей смены и идентифицированные уникальным кодовым номером.

**Гемагглютинация:** Процесс склеивания и последующего осаждения эритроцитов крови; вызывается [гемагглютининами](https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/009/225.htm), бактериями и вирусами, агентами, способными адсорбироваться на поверхности эритроцитов.

**Дендритные отростки:** Разветвлённый отросток нейрона, который получает информацию через химические (или электрические) синапсы от аксонов (или дендритов и сомы) других нейронов и передаёт её через электрический сигнал телу нейрона (перикариону), из которого вырастает.

**Ингибирование:** Торможение химических реакций в пламени, обусловленное гибелью активных центров (радикалов и атомарных частиц, имеющих свободные валентности) в результате воздействия на них специальных веществ (ингибиторов).

**Инцидентность:** Оценка частоты новых инфекций в восприимчивой популяции в течение определенного периода времени.

**Исходные посевные клетки (линия, посев, расплодка):** Коллекция аликвот клеток определенного уровня пассажа для использования при приготовлении или тестировании биологического продукта, которые распределили в контейнеры во время одной операции, обработали вместе и хранят таким образом, чтобы обеспечить единообразие и стабильность и предотвратить контаминацию.

**Исходный вирус (возбудитель, штамм):** Коллекция аликвот организма определенного уровня пассажа, из которых получают все другие посевные пассажи, полученные из одной обшей партии, распределенные в контейнеры во время одной операции, обработанные вместе и хранящиеся таким образом, чтобы обеспечить однородность и стабильность и предотвратить контаминацию.

**Иммуногенность:** Иммуногенность биологического продукта – концентрация иммунологически активного компонента. В случае вакцины это концентрация специфического иммуногена, а в случае антисыворотки – концентрация специфического антитела.

**Информирование о рисках:** Процесс взаимного обмена информацией и мнениями в ходе процедуры анализа риска, предметом которого является сам риск, его факторы и заключения. Информацией обмениваются специалисты, которым поручена оценка риска, управление им и информирование о нем, население и другие заинтересованные участники.

**Линия клеток:** Стабильно трансформированная линия клеток, обладающая высокой способностью к размножению *in vitro*.

**Значение порогового цикла (Ct):** Количество циклов амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, необходимое для того, чтобы сигнал флуоресценции превысил фоновый сигнал.

**Ложноотрицательная (перекрестная) реакция:** Отрицательная реакция в анализе исследуемого образца, полученного от животного, подвергавшегося воздействию или инфицированного определенным организмом, возможно, ввиду отсутствия аналитической чувствительности, ограниченной аналитической специфичности или разложения аналита, снижает диагностическую чувствительность.

**Ложноположительная реакция:** Положительная реакция в анализе, полученная не в результате воздействия или инфицирования определенным организмом, возможно, ввиду иммунологической перекрестной реактивности, перекрестной контаминации исследуемого образа или неспецифичных реакций, снижает диагностическую специфичность.

**Квалификационные испытания:** Одна оценка компетентности лаборатории, полученная путем межлабораторных сличительных испытаний; в данном определении подразумевается, что лаборатории-участники используют одни и те же методы тестирования, реактивы и контроли, и что результат представляется в количественном выражении.

**Качественная оценка риска**: Оценка риска, при которой результаты изучения вероятности эпизоотического происшествия и размеров его последствий выражаются в качественных категориях: повышенный, средний, низкий или незначительный.

**Количественная оценка риска:** Оценка риска, при которой результаты оценки риска выражаются в цифровых значениях.

**Контроль в процессе производства:** Испытания, которые проводятся во время производства биологического продукта для обеспечения соответствия продукта согласованным стандартам качества.

**Комнатная температура:** Термин «комнатная температура» подразумевает температуру комфортной рабочей среды. Точные пределы комнатной температуры установить невозможно, но приблизительные границы составляют 18-25C. Если в тесте указана комнатная температура, ее, при необходимости, следует обеспечить с помощью кондиционирования воздуха; иначе это может отразиться на параметрах тестирования.

**Конвульсия:** Резкое непроизвольное сокращение [мышц](https://ru.wiktionary.org/wiki/%D0%BC%D1%8B%D1%88%D1%86%D0%B0); [судорога](https://ru.wiktionary.org/wiki/%D1%81%D1%83%D0%B4%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B0).

**Лабораторная биобезопасность:** Лабораторная биобезопасность описывает принципы и практику предотвращения непреднамеренного воздействия биологических материалов или их случайного высвобождения.

**Лабораторная биозащита:** Лабораторная биозащита описывает меры контроля за биологическими материалами в лабораториях с целью предотвращения их потери, кражи, неправильного использования, несанкционированного доступа или преднамеренного несанкционированного высвобождения.

**Межлабораторные сравнительные испытания (кольцевые испытания):** Любая оценка рабочих характеристик анализа и/или компетентности лаборатории при тестировании определенных образцов в двух или более лабораториях; одна лаборатория должна выступать в роли референтной при определении характеристик исследуемого образца.

**(Международные) стандартные реактивы:** Стандартные реактивы, по которым калибруют все остальные реактивы и анализы; готовятся и распространяются Международной референтной лабораторией.

**Метод тестирования:** Специальная техническая процедура для выявления аналита (синоним – анализ).

**Мультиплексное выявление вирусных:** Мультиплексный ПЦР тест, направленный на выявление вирусов гепатита B и С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в плазме крови, используемой для получения биопрепаратов.

**Национальные стандартные реактивы:** Стандартные реактивы, калиброванные в сравнении с Международными стандартными реактивами; готовятся и распространяются Национальной референтной лабораторией.

**Пирексия** (лихорадка): Рассматривается как адаптивный ответ на физиологический стресс, который регулируется через эндогенные пирогенные и антипиретические пути и связан с увеличением гипоталамического заданного значения.

**Повторяемость:** Уровень согласованности между репликатами образца как внутри цикла, так и между циклами одного и того же метода тестирования в данной лаборатории.

**Предел обнаружения (LOD):** Расчетное количество аналита в указанной матрице, которое позволит получить положительный результат, по крайней мере в указанном проценте случаев, и которое является мерой аналитической чувствительности.

**Прогнозируемое значение (отрицательное):** Вероятность того, что животное не заражено, учитывая, что тесты отрицательные; прогнозируемые значения – это функция диагностической чувствительности (Dse) и диагностической специфичности (DSp) диагностического анализа и превалентности инфекции.

**Прогнозируемое значение (положительное):** Вероятность того, что животное заражено, учитывая, что тесты положительные; прогнозируемые значения – это функция диагностической чувствительности (DSe) и диагностической специфичности (DSp) диагностического анализа и превалентности инфекции.

**Превалентность:** Оценка процента инфицированных животных в популяции в определенный момент времени; не путать с инцидентностью.

**Первичные клетки:** Пул первоначальных клеток, полученных из нормальной ткани до десятого субкультивирования включительно.

**Производственный посевной вирус:** Организм определенного уровня пассирования, который используется без дальнейшего размножения для запуска подготовки производственной партии.

**Проба:** Материал, который получен из образца и используется для целей тестирования.

**Рабочие характеристики:** Свойства метода тестирования, которые могут включать аналитическую чувствительность и специфичность, точность: и сходимость, диагностическую чувствительность и специфичность и/или повторяемость и воспроизводимость.

**Рабочие характеристики приемника (ROC):** ROC-анализ представляет собой независимый от точки разделения метод оценки глобальной точности теста, при котором результаты измеряются в порядковых значениях или в значениях в непрерывном режиме. Площадь под ROC-кривой представляет собой единую цифровую оценку общей точности в диапазоне от 0,5 (бесполезный тест) до 1 (отличный тест).

**Рабочие стандарты (реактивы):** Стандартные реактивы, калиброванные путем сравнения с национальным стандартным реактивом или – при отсутствии национального стандартного реактива – калиброванные против хорошо охарактеризованного внутреннего стандартного реактива; включены в стандартные диагностические тесты в качестве контроля и/или для нормализации результатов тестов.

**Рабочий посевной вирус:** Организм на уровне пассирования между исходным посевным вирусом и производственным посевным вирусом.

**Референтная лаборатория:** Лаборатория, обладающая признанным научным и диагностическим опытом в области определенной болезни животных и/или метода тестирования; включает возможность для характеристики и присвоения значения референтным реактивам и пробам.

**Риск:** Вероятность возникновения и потенциальный масштаб последствий какого-либо происшествия, способного нанести вред здоровью животных или человека с биологической или экономической точки зрения.

**Сравнение методов (проверка эквивалентности):** Определение конкретных аналитических рабочих характеристик новых или различных методов тестирования посредством межлабораторного сличения со стандартным методом тестирования; в данном определении предполагается, что лаборатории-участники используют свои собственные методы тестирования, реагенты и контроли, и что результаты представляются в количественном выражении.

**Сходимость:** Степень разброса (дисперсия, стандартное отклонение или коэффициент вариаций) в рамках серии измерений одного и того же образца, исследуемого в специфических условиях.

**Свободный от специфических патогенов (СПФ):** Животные, признанные свободными от определенных патогенных микроорганизмов с использованием надлежащих тестов; также это относится к яйцам, полученным от СПФ птиц.

**Специфичность (аналитическая):** Степень, до которой анализ проводит дифференциацию между целевым аналитом и другими компонентами в матрице пробы; чем выше аналитическая специфичность, тем ниже уровень ложноположительных результатов.

**Специфичность (диагностическая):** Процент эталонных, точно не зараженных животных с отрицательным результатом в анализе; неинфицированные эталонные животные с положительными результатами считаются ложноположительными.

**Специфичность (относительная):** Процент эталонных животных, определенных как отрицательные с использованием одного или нескольких методов тестирования, которые также дают отрицательные результаты в анализе при сравнении.

**Субклиническое заболевание или латентная форма гипотиреоза**: Результат угнетения функции щитовидной железы под воздействием различных факторов. На начальном этапе работают компенсаторные механизмы. В ответ на гипофункцию щитовидной железы гипофиз вырабатывает больше тиреотропного гормона.

**Стерильность:** Отсутствие жизнеспособных контаминирующих микроорганизмов, продемонстрированное утвержденными или надлежащими тестами.

**Тепловая инактивация:** 1) необратимая денатурация большинства ферментов при воздействии температурой выше 60 °С, часто используется для остановки действия различных ферментов, используемых в генной инженерии (рестрикционных эндонуклеаз, лигаз и др.); 2) обезвреживание повышенной температурой вирусов и бактерий, содержащихся в продуктах питания, в медицинских препаратах и др.

**Типирование крови**: Несложная процедура, во время которой у донора берут одну пробирку крови до 10 миллилитров – как при обычном анализе крови. Образец исследуют в специализированной лаборатории, определяют набор генов, отвечающих за совместимость и после этого вносят клетки в базу.

**Тесты:**

**- Скрининговые:** Тесты, обладающие высокой диагностической чувствительностью, пригодные для крупномасштабного применения.

- **Подтверждающие:** Методы тестирования, обладающие высокой диагностической специфичностью, которые используются для подтверждения результатов, обычно положительных, полученных с использованием других методов тестирования.

**Термоустойчивый:** Термин используется для описания способности вакцины и/или родительского вируса/штамма сохранять уровень инфекционности после воздействия нагревания, т.е. отложенная термодеградация вируса.

Примечание - Например, в случае термоустойчивой вакцины против болезни Ньюкасла I-2 это определяется периодом времени, в ходе которого вакцина сохраняет титр инфективности, достаточный для индуцирования защитного иммунитета при определенной температуре.

Можно также встретить термин «отложенная термодеградация», но термин «термоустойчивость» предпочтительный. Считается, что термины «терморезистентный» и «термостабильный» создают несбыточные ожидания в отношении свойств вакцины, и их следует избегать.

**Точка разделения/пороговое значение:** При иммунологическом анализе точка разделения или пороговые значения – это значения, которые выбираются для разграничения отрицательных и положительных результатов, и могут включать неопределенную зону или зону с подозрением.

**Транзиторная виремия, вирусемия:** Состояние организма, при котором [вирусы](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81) попадают в кровоток и могут распространяться по всему телу. Аналогично [бактериемии](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%8F), при которой в кровоток попадают бактерии. Вирусемия делает возможной передачу вирусов [трансмиссивным](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%BC%D0%B8%D1%81%D1%81%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BD%D0%B8) путём.

**Чистота:** Качество биологического продукта в готовом виде относительно свободного от инородных микроорганизмов и инородного материала (органического или неорганического) по результатам методов тестирования, подходящих для продукта; и свободного от внешних микроорганизмов или материала, который может отрицательно повлиять на безопасность, иммуногенность или эффективность продукта.

**Чувствительность (аналитическая):** Наименьшее количество аналита, которое можно измерить с определенной долей уверенности; аналит может включать антитела, антигены, нуклеиновые кислоты или живые организмы.

**Чувствительность (диагностическая):** Процент эталонных животных с известным заражением и с положительным результатом в анализе; инфицированные животные с отрицательным результатом в анализах считаются животными с ложноположительными результатами.

**Чувствительность (относительная):** Процент эталонных животных, определенных как положительные с использованием одного или нескольких методов тестирования, которые также дают положительные результаты в анализе при сравнении.

**Фиксация комплемента:** Степень фиксации комплемента указывает на относительное количество антитела в образце. Анализ может измерить титры антитела IgM и IgG или может быть модифицирован, чтобы обнаружить определенные антигены.

**Филогеография:** Исследование генетической или географической структуры популяций и видов.

**Эффективность:** Особая способность биологического продукта продуцировать результат, для которого он предлагается при условии применения в условиях, рекомендованных производителем.

**3 Сокращения**

ВЛЭ, ЗЛЭ и ВенЛЭ - Восточный, западный и венесуэльский энцефаломиелит лошадей

РТ-ПЦР Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

ИФА Иммуноглобулин М иммуноферментный анализ

ИГК Иммуногистохимические процедуры

ПЦР Полимеразная цепная реакция;

RT-PCR ПЦР с обратной транскрипцией

CF Фиксация комплемента

PRN Иммунофлуоресценция или тест на нейтрализацию уменьшения бляшек.

БСА Сывороточный альбумин

ИГК Иммуногистохимические процедуры

ABTS 2,2-азино-ди (3-этил- бензотиазолин) сульфоновая кислота

SAT Реакция агглютинации на стекле;

ТАТ Реакция агглютинации в пробирке;

МАТ Реакция микроагглютинации;

ELISA Твердофазный иммуноферментный анализ.

ЕМТМ Среда Тоби, модифицированная по Эвансу

AGID Иммунодиффузия в агаровом геле

EYL Дрожжевой лактальбумин Эрла

ATCC 1 Американская коллекция типовых культур

РИФ Реакция иммунофлуоресценции

ВВАТ Исследовани с забуференным антигеном Brucella

FAVN Реакция вируснейтрализации флуоресцентными антителами

BCIP 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат

ФБС Фетальная бычья сыворотка

FITC Флуоресцеин изотиоцианат

BGPS Мясо-пептонный сывороточный бульон с глюкозой

FPA Флуоресцентная поляризация

BLP Забуференная лактозо-пептонная вода

g Относительная центробежная сила

ВРАТ Исследование антигена на забуференном планшете

РПР Реакция подавления роста

БСА Бычий сывороточный альбумин

РГА Реакция гемагглютинации

ГС Гемабсорбция

ХАМ Хориоаллантоисная мембрана

HBSS Сбалансированный солевой раствор

САТ Реакция агглютинации на карте

H&E Гематоксилин и эозин (краситель)

ФКЭ Фибробласты куриных эмбрионов

НЕР Многократное пассирование в яйце

РСК Реакция связывания комплемента

НЕРА Высокоэффективный воздушный фильтр

КОЕ Колониеобразующая единица

HEPES 4-(2оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота

ВИЭФ Встречный иммуноэлектрофорез

РТГА Реакция торможения гемагглютинации

СК Почки теленка (клетки)

HRPO Пероксидаза хрена

ЦНС Центральная нервная система

ИБ Иммуноблот анализ

ЦПД Цитопатогенное действие

МЕ РСК Международная единица реакции связывания комплемента

CPLM Цистеино-пептонная мальтоза с печеночным экстрактом (среда)

ICPI Индекс интрацереабральной патогенности

CSY Казеино-сахарозно-дрожжевой агар

ID50 Средняя инфицирующая доза

Сt Пороговый цикл (ПЦР исследования)

РНИФ Реакция непрямой иммунофлюоресценции

DEPC Диэтилпилокарбонат

IGRA Тест, основанный на определении высвобождения гамма-интерферона

DIVA Выявление инфекции среди вакцинированных животных

РНГА Реакция непрямой гемагглютинации

DMEM Модифицированная по методу Дульбекко среда

IPMA Монослойный иммунопероксидазный анализ

DMSO Диметил сульфид

МЕ Международная единица

DTH Гиперчувствительность замедленного типа

IVPI Индекс внутривенной патогенности

ЭДТК Этилендиаминтетрауксусная кислота

LA Агглютинация латекса

ЭГТК Этиленгликоль тетрауксусная кислота

LD Летальная доза

EID Доза, инфицирующая яйцо

LEP Кратковременное пассирование в яйце

ИФА Иммуноферментный анализ

ЛПС Липополисахарид

MAb Моноклональное антитело

БОЕ Бляшкообразующая единица

МРА Микроскопическая реакция гемагглютинации

РПГА Реакция пассивной гемагглютинации

MCS Банк исходных клеток

PPD Очищенный белковый продукт

MDBK Клетки Мадин-Дарби почек

КРС Клеточная линия

PPLO Плевропневмония-подобный организм

MDT Среднее время гибели

НБО Реакция нейтрализации бляшкообразования

МЕМ Минимальная обогащенная среда

PSG Фосфатно-буферный солевой раствор глюкозы

ГКГС Главный комплекс гистосовместимости

RBC Красные кровяные тельца

MLV Модифицированный живой вирус (вакцинный)

ПДРФ Полиморфизм длины фрагментов рестрикции

m.o.i. Множественность заражения

MSV Исходный посевной вирус

Об/мин Оборотов в минуту

NI Индекс нейтрализации

RSA Экспресс реакция сывороточной агглютинации

NBT Нитросиний тетразолий

ОТ-ПЦР Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

NPLA Анализ связанной пероксидазы

SAT Реакция сывороточной агглютинации

ОП Оптическая плотность

SDS Додецилсульфат натрия

OGP 1-октил-бета-D-глюкопиранозид (буфер)

СОП Стандартная операционная процедура

OPD Ортофенилендиамин (хромоген)

СПФ Свободный от патогенных факторов

OPG Оксалаза-фенол-глицерин (консервирующий раствор)

SPG Сахароза-фосфат-глутаминовая кислота

ОРС Открытая рамка считывания

SRBC Эритроциты овцы

ПААГ Электрофорез

ТЦД50 Электрофорез в полиакриламидном геле

50 % Средная инфицирующая тканевую культуру доза

ПАП Пероксидаза-антипероксидаза (процедура окрашивания)

ТМБ Тетраметилбензидин

ШИК-реакция Реакция Шифф-йодная кислота

TSI Тройной сахарный железосодержащий агар

ФБР Фосфатно-буферный раствор

VB Вероналовый буфер

VBS Вероналовый буферный солевой раствор

PD Защитная доза

Vero Клетки почки африканской зеленой мартышки

PFGE Гель-электрофорез в пульсирующем поле

РВН Реакция вируснейтрализации

**4 Диагностические методы**

**Таблица 1**. Тесты, доступные для диагностики туляремии и их цели

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Метод | **Цель** | | | | | |
| Свобода популяции от инфекции | Свобода отдельных животных от инфекции перед  перемещением | Содействие политике искоренения | Подтвержде ние  клинических случаев | Распростра нение инфекции – надзор | Иммунный статус у отдельных  животных или популяций после вакцинации |
| **Идентификация агента1** | | | | | | |
| Выделение бактерии | - | - | - | +++ | - | Не применимо |
| Выявление антигена | - | - | - | +++ | - | Не применимо |
| ПЦР в  реальном времени | +++ | - | - | +++ | +++ | Не применимо |
| **Выявление иммунной реакции** | | | | | | |
| **SAT** | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | Не применимо |
| **TAT** | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | Не применимо |
| **MAT** | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | Не применимо |
| **ELISA** | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | Не применимо |

где,

+++ рекомендуемый метод;

++ подходящий метод;

+ может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы строго ограничивают его применение;

- не подходит для этой цели.

Примечание - Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++, прошли формальную валидацию, их рутинный характер и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими.

**4.1 Идентификация агента**

Francisella tularensis (F. Tularensis) может быть продемонстрирована в мазках или в гистологических срезах. Так как патологоанатомическая картина меняется, иногда трудно поставить диагноз, и предпочтительными являются иммунологические и иммуногистохимические методы, хотя могут быть трудности в приобретении реагентов. Иногда можно рекомендовать, чтобы фиксированные образцы анализировали в лабораториях, имеющих надлежащие реагенты или методы. Ее также можно идентифицировать при помощи культуры. Однако могут быть трудности в выделении *F. tularensis* из погибших животных и туш в связи с чрезмерным ростом других бактерий. В таких случаях можно использовать селективную культуральную среду или заражение животных. ПЦР является безопасным и удобным способом выявления и идентификации *F. tularensis* в клинических образцах.

При туляремии туши, органы и шкуру, полученные от больных или подозреваемых на заболевание животных, утилизируют согласно [1].

Примечание - Рекомендуется комбинация методов идентификации агентов в отношении одного и того же клинического образца.

* + 1. **Препараты-мазки**

Препараты-мазки готовятся на предметных стеклах микроскопа как мазки-отпечатки органов, таких как печень, селезенка, костный мозг, почки, легкие или кровь. В таких мазках имеется изобилие бактерий, но их можно не увидеть из-за очень маленького размера (0,2-0,7 мкм). Бактерии демонстрируются при помощи прямого или непрямого окрашивания флюоресцирующими антителами. Данное средство диагностики является безопасным, быстрым и специфичным.

Окрашивание мазков по методу Грама показывает рассеяние мелких точкообразных грамотрицательных бактерий в пределах видимости. Использование масляной микроскопии повышает видимость бактерий. Может быть трудно отличить бактерии от осадка красителя.

* + 1. **Гистологические срезы**

Бактерии могут быть обнаружены в срезах при помощи иммуногистохимических методов, таких как реакция иммунофлюоресценции (РИФ) или иммуногистохимии. Реакция проводится на образцах органов, которые фиксируют на нейтральном буферном формалине и заливают в парафин. Предметные стекла обрабатывают кроличьей или мышиной антитуляремийной сывороткой, промывают и затем обрабатывают антикроличьей или антимышиной сывороткой, конъюгированной с флуоресцинизотиоцианатом или меченой пероксидазой хрена. Образцы исследуют при помощи флуоресцентного или оптического микроскопа, где в некротических поражениях и в крови выявляется большое количество бактерий.

* + 1. **Культивирование**

*Francisella tularensis* не растет на обыкновенных питательных средах, хотя случайные штаммы могут вырасти при изначальной изоляции, на кровяном агаре. Инкубирование проводится при 37°С в окружающем воздухе или в 5% СО2. Для культивирования должны использоваться кровь из сердца, печень, селезенка, костный мозг или туляремийные гранулемы (из легких, околосердечной сумки, почек, печени, селезенки и т.д.) от умирающих животных.

Применяются специальные питательные среды согласно п.п. 4.1.4-4.1.6.

**4.1.4** **Среда Френсиса**

Пептонный агар, содержащий 0,1% цистина (или цистеина) и 1% глюкозы, к которому добавляют до загустения, 8-10% дефибринированной кроличьей, лошадиной или человеческой крови.

* + 1. **Cреда Мак-Коя и среда Чепина**

Состоит из 60 г желтка куриных яиц и 40 мл физиологического раствора; среду аккуратно смешивают и коагулируют при нагревании до 75 °С.

**4.1.6** **Модифицированный агар Тайера-Мартина**

Основа глюкозо-цистеинного агара, дополненная гемоглобином и IsoVitaleX.

Среда может храниться до 8-10 дней при 4°С. Колонии, которые образуются на среде Мак Коя и Чепина, являются мелкими, выпуклыми, круглыми и прозрачными. Более интенсивный рост бактерий происходит на среде Френсиса и модифицированном агаре Тайера-Мартина, при котором образуются сливающиеся колонии беловатого цвета и слизистой консистенции. На любой среде колонии не появляются ранее, чем через 48 часов инкубирования при 37°С.

Следующая селективная питательная среда используется в дополнение к неселективной питательной среде: цистеиновый кровяной агар с 7,5 мг колистина, 2,5 мг амфотерицина, 0,5 мг линкомицина, 4 мг триметоприма и 10 мг ампициллина на литр (ВОЗ, 2007).

Дифференциальные критерии для идентификации *F. tularensis* включают отсутствие роста на обыкновенных питательных средах, характерную клеточную морфологию и специфичные реакции с флюоресцирующими антителами и реакции агглютинации на предметном стекле. Бактерии неподвижны, не образуют споры, имеют биполярную окраску и имеют однородный вид в 24-часовых культурах, но являются плеоморфными в более старых культурах.

Francisella tularensisможно определить в окрашенных мазках путем агглютинации с гипериммунной антисывороткой против туляремии или при помощи заражения животных. В районах Северной Америки, где могут встречаться оба типа *F. tularensis,* Тип А можно отличить от Типа В основываясь на том факте, что большинство изолятов Типа А ферментируют глицерин.

Бактерии идентифицируются также при помощи ПЦР.

* 1. **Заражение животных**

Заражение животных не рекомендуется из соображений благополучия животных. Его следует проводить только когда выделение на лабораторных животных считается неизбежным, и только там, где имеются надлежащие помещения и клетки с биозащитой [2].

Туляремийную гранулему или кусочек септицемического органа (например, селезенка, печень) отрезают и приблизительно 1 г образца ткани гомогенизируют и суспендируют в 2 мл физиологического раствора.

Лабораторных животных (предпочтительно мышей) заражают подкожно с использованием 0,5 мл суспензии. Заболевшие животные погибнут через 2-10 дней после заражения. Образцы крови из сердца и образцы костного мозга вносят в культуральную среду в день гибели лабораторного животного.

* 1. **Молекулярные методы**

Методы на основе ПЦР подходят для выявления ДНК *F. tularensis* непосредственно из образцов от людей, животных и окружающей среды. Они также могут определить подвиды или генотипы *F. tularensis,* либо в выделенных штаммах, либо непосредственно в клинических образцах.

Методы для выявления ДНК *F. tularensis,* которые использовались, включают классическую ПЦР и ПЦР в реальном времени. Следует отметить, что при ПЦР-тестировании клещей следует использовать специфические генные мишени или секвенирование ПЦР-фрагментов для того чтобы отличить *F. tularensis* от *Francisella*-подобных эндосимбионтов.

Традиционная ПЦР-система, нацеленная на 16S ген рРНК с последующим секвенированием ПЦР-продукта, была разработана для выявления *F. tularensis* и *F. philomiragia* а также *Francisella*-подобных эндосимбионтов клещей со следующей парой праймеров: Fr153F0.1: 5’-GCC-CAT-TTG-AGG-GGG- ATACC-3’ и Fr1281R0.1: 5’-GGA-CTA-AGA-GTA-CCT-TTT-TGA-GT-3’. Условия циклирования включают первичную денатурацию в течение 10 минут при 95°C, за которой следует 30 амплификационных циклов денатурации по 30 секунд при 94°C, отжиг праймера при 60°C в течение 1 минуты и удлинение при 72°C в течение 1 минуты.

Система ПЦР в реальном времени, нацеленная на ген *tul4* для специфического выявления только *F. tularensis* со следующими праймерами и зондом: Tul4F: 5’-ATT-ACA-ATG-GCA-GGCTCC-AGA-3’, Tul4R: 5’- TGC-CCA-AGT-TTT-ATC-GTT-CTT-CT-3’ и Tul4P: FAM-5’-TTC-TAA-GTGCCA-TGA-TAC-AAG-CTT-CCC-AAT-TAC-TAA-G-3’-BHQ.

Зонд синтезируется с использованием репортерной группы, состоящей из 6-карбоксифлуоресцеина, присоединенного к 5’концу и гасителя флуоресценции «черная дыра», присоединенного к 3’концу. ПЦР состоит из первичной денатурации в течение 10 минут при 95°C, за которой следует 45 амплификационных циклов денатурации по 15 секунд при 95°C, отжиг праймера при 60°C в течение 30 секунд.

Некоторые системы ПЦР, canSNP (канонический одиночный нуклеотидный полиморфизм), типирование canINDELs (канонические вставки и делеции) и MLVA (анализ мультилокусов с варьирующимся числом тандемных повторов), являются подходящими методами для дифференциации подвидов и генотипов *F. tularensis*.

1. **Серологические тесты**

Серология используется для диагностики туляремии у людей, но она имеет ограниченную пользу в отношении чувствительных видов животных, которые обычно умирают, прежде чем вырабатываются специфичные антитела. Серология применяется либо на сыворотках, либо на экстрактах легких при эпидемиологических исследованиях животных, устойчивых или относительно устойчивых к инфекции, таких как овцы, крупный рогатый скот, свиньи, лоси, собаки, лисы, кабаны, птицы или заяц-русак в центральной Европе. Так как не существует антигенных различий между штаммами Типа А и Типа В, менее вирулентный подвид *F. tularensis,* а именно *holarctica,* и его аттенуированный живой вакцинный штамм можно использовать как антиген во всех серологических тестах.

* 1. **Реакции агглютинации**

Наиболее часто используемым серологическим тестом является реакция агглютинации. Антигеном является культура *F. tularensis* на среде Френсиса. Культуру собирают через 5-6 дней. Незрелые культуры дают недостаточный выход антигенов.

Колонии суспендируют в 96% спирте, с получением густой суспензии, которую можно хранить от 1 до 7 дней при комнатной температуре. Осадок промывают физиологическим раствором и ресуспендируют в равном объеме физиологического раствора. Порошок кристаллвиолета добавляют к конечной концентрации 0,25%. Бактерии окрашивают при помощи добавления кристаллвиолета и инкубирования при 37°С в течение как минимум 24 часов и не более 7 дней.

После сливания надосадочной жидкости, осадок суспендируют в физиологическом растворе с тимеросалом (мертиолят) или без него при конечной концентрации 1/10000, или с формальдегидом при конечной концентрации 0,5%. Суспензию калибруют с использованием положительных и отрицательных сывороток, и корректируют путем добавления физиологического раствора для получения антигена, который при тестировании на предметном стекле дает хорошо видимые окрашенные реакции агглютинации на прозрачном фоне жидкости.

Следует принимать во внимание возможные перекрестные реакции с *Brucella и Legionella* sp. типа S.

* + 1. **Реакция агглютинации на стекле**

Это полезный метод для работы в полевых условиях. При реакции агглютинации на стекле 1 каплю цельной крови (приблизительно 0,04 мл) смешивают с 1 каплей антигена, и реакция считается положительной, если хлопья появляются в течение 1-3 минут при 20-25°С.

* + 1. **Реакция агглютинации в пробирке**

Тест проводится в пробирках, содержащих фиксированное количество антигена (0,9 мл) и различные разведения сыворотки, начиная с 1/10, 1/20, 1/40 и т.д. Результаты считывают через 20 минут взбалтывания или через 1 час нахождения на водяной бане при 37°С с последующим хранением при комнатной температуре в течение ночи. Агглютинированный осадок виден невооруженным глазом или желательно с использованием лупы. Положительные пробирки – это те пробирки, в которых имеется прозрачная надосадочная жидкость.

* + 1. **Реакция микроагглютинации**

Тест проводится на микротитрационных планшетах. Серийные двукратные разведения сывороток (25 мкл) смешивают с равным объемом инактивированной формалином цельноклеточной суспензии. Результаты считывают после инкубирования при 37°С в течение 18 часов. Агглютинированный осадок виден невооруженным глазом или желательно с использованием лупы. Положительные лунки – те лунки, в которых имеется прозрачная надосадочная жидкость.

* 1. **Твердофазный иммуноферментный анализ**

Другой серологический тест, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) также позволяет осуществить раннюю диагностику туляремии. Различные антигены, цельные бактерии, а также субклеточные компоненты (например, очищенный липополисахарид) использовались как антигены- приманки против иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG; через 2 недели после начала туляремии специфичные антитела можно выявить в сыворотке. IgM сохраняется в течение длительного периода и не может использоваться в качестве признака «свежей» инфекции. Для рутинной диагностики можно использовать цельные термоинактивированные (65°С в течение 30 минут) бактерии в качестве антигена. Бактерии можно нанести на пластмассовые планшеты с использованием обычных методов с последующими серийными разведениями сыворотки, подлежащей тестированию.

Положительные реакции можно увидеть при помощи антител, меченых ферментом. Тест также следует считывать в фотометре с положительными и отрицательными сыворотками в качестве контролей.

**6. Требования к вакцинам**

Живой аттенюированный вакцинный штамм *holarctica*, подвид *F. tularensis* (LVS, NCTC 10857) десятилетиями использовался в качестве вакцины против туляремии, особенно для лаборантов, работающих с большим объемом культуры *F. tularensis*. Данная вакцина более не используется в связи с ее общей ограниченной эффективностью и вероятностью возврата к вирулентности.

Примечание - Новые вакцины против туляремии находятся в стадии разработки, но еще не лицензированы для использования для людей или животных.

**Библиография**

[1] «Об утверждении Ветеринарных (ветеринарно-санитарных) правил», утвержденные приказом Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 29 июня 2015 года № 7-1/587.

[2] Глава 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарных лабораториях и вивариях Руководства по наземным животным.

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, туляремия, ветеринария, МЭБ, ВОЗЖ. |
|  |

|  |
| --- |
| **МКС 11.220**  **Ключевые слова:** животные, лабораторная диагностика, туляремия, ветеринария, МЭБ, ВОЗЖ. |
|  |

**РАЗРАБОТЧИК:**

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

|  |  |
| --- | --- |
| **Заместитель**  **Генерального директора** | **Е. Амирханова** |
| **Руководитель**  **Департамента разработки НТД** | **А. Сопбеков** |
| **Ведущий специалист**  **Департамента разработки НТД** | **Ж. Бейсен** |