



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

Жануарлар

ПАРАТУБЕРКУЛЕЗДІ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ

Животные

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА

ҚР СТ 3504-2019

(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, NEQ)

Ресми басылым

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)**



Нұр-Сұлтан

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3504-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

Жануарлар

ПАРАТУБЕРКУЛЕЗДІ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ

ҚР СТ 3504-2019

(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, NEQ)

Ресми басылым

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)**

Нұр-Сұлтан



Алғысөз

1 «Elit Art» ЖШС ДАЙЫНДАП ЕНГІЗДІ

2 Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитеті төрағасының 2019 жылғы 11 желтоқсандағы № 457-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП, ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

3 Осы стандарт «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals» (Жануарлар. Паратуберкулезді зертханалық диагностикалау әдістері) Халықаралық эпизоотикалық бюро нұсқауын есепке алып әзірленген.

Сәйкестік дәрежесі – балама емес (NEQ).

Ағылшын тілінен (en) аударылған.

4 Осы стандартта Қазақстан Республикасының «Стандарттау туралы» 2018 жылғы 5 қазандағы № 183-VI, «Ветеринария туралы» 2002 жылғы 10 шілдедегі № 339 Заңдарының ережелері іске асырылған.

5 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ

Осы стандартқа енгізілген өзгерістер туралы ақпарат жыл сайын басып шығарылатын «Стандарттау жөніндегі нормативтік құжаттар» ақпараттық каталогында, ал өзгерістер мен түзетулер мәтіні мерзімді басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтемелерінде жарияланады. Осы стандарт қайта қаралған (ауыстырылған) немесе жойылған жағдайда, тиісті хабарлама мерзімді басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтемесінде жарияланады

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде толықтай немесе бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды



Кіріспе

Паратуберкулез (Ионе ауруы) - *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) тудырған күйіс қайыратын жануарлардың созылмалы энтериті. Паратуберкулез көбіне күйіс қайыратын үй жануарларында (сиырлар, қойлар, ешкілер, түйелер және буйволдар), сондай-ақ жабайы күйіс қайыратын жануарларда (бұғы) кездеседі және кеңінен таралған. Сондай-ақ ауру жылқылар, шошқалар, қояндар, ақкістер, түлкілер және аққалақтар арасында да тіркелген. Табиғи жағдайларда ірі қара малдың ауруы контаминацияланған сыртқы ортадан MAP-тың организмге түсуі кезінде таралады. MAP сәйкестендіру оның микобактинге деген қажеттілігіне және оның клиникалық белгілермен және өсіру және ПТР нәтижелері сияқты белгілі бір зертханалық деректермен байланысына негізделген. Паратуберкулездің клиникалық белгілері баяу үдемелі әлсіреу және диарея болып табылады, ол ең алдымен үзік-үзік сипатта болады да, біртіндеп ірі қара малда тұрақты болғанша одан әрі ауырлай түседі. Ерте зақымданулар аш ішектің қабырғаларында және шажырқайлық лимфа түйіндерінде пайда болады және инфекция осы сатысында осы учаскелермен шектеледі. Аурудың өршуіне байланысты ірі зақымданулар мықын ішекте, аш ішекте, аш ішектің терминалды бөлігінде, соқыр ішекте және тоқ ішекте, сондай-ақ шажырқайлық лимфа түйіндерінде пайда болады. MAP зақымдану ошақтарында және нәтижесінде бүкіл денеде болады. Ішектің зақымдануы ақуыздың кемуіне және ақуыздың мальабсорбция синдромына жауапты, олар бұлшықеттің әлсіреуіне алып келеді. Клиникалық белгілері әдетте алғаш рет жас кезінде пайда болады, бірақ ауру 1-2 жастан асқан кез келген жастағы жануарларда пайда болуы мүмкін, ал сүтті малда көбіне 3-5 жас тобында байқалады.

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3504-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ**Жануарлар****ПАРАТУБЕРКУЛЕЗДІ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ**

Енгізілген күні 2020-07-01

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт паратуберкулездің зертханалық диагностикасы бойынша әдістемелік нұсқауларды анықтайды:

- бактериологиялық әдіс;
- вирусологиялық әдістер (гамма-интерферон, баяу типті гиперсезімталдық (тері сынамасы));
- гистологиялық әдіс;
- ПТР әдісі;
- серологиялық әдістер (ИФА, РСК, РИД).

2 Қысқарған сөздер**Микромоль; мкМ****Микролитр; мкл****Моль; М****Миллиграмм; мг****Нитроцеллюлозды мембрана; НЦМ****Полимеразды тізбекті реакция; ПТР****Имуноферменттік талдау; ИФА****Комплиментті байланыстыру реакциясы; РСК****Агар геліндегі иммунодиффузия реакциясы; РИД****3 Жалпы ережелер**

3.1 Паратуберкулезді диагностикалау өсіріндіде қоздырғышты бөліп алу және оны реакциялардың бірінде сәйкестендіру болып табылады.

3.2. Паратуберкулезге диагнозды зерттеу нәтижелерінің, эпизоотологиялық және клиникалық деректердің, сондай-ақ патологоанатомиялық өзгерістердің негізінде қояды.

4 Сынамаларды іріктеу және дайындау

Бактериоскопиялық зерттеу үшін тірі жануарлардан кемінде 10 см³ нәжіс пен тік ішектің шырышты қабығының қыртыстары алынады.

Өлген немесе сойылған малдардан кем дегенде үш-бес түрлі ішек, екі-төрт бүріккіш лимфа түйіндері, жапсарлас лимфа түйіндері бар илеоцекальды жапқыштың бір бөлігі алынады. Патологиялық материалды іріктеу кезінде, ең алдымен, ішектің қалындауы, шырышты қабықтың қатпарлығы мен үлкейген лимфа түйіндерін алады.

Патологиялық материалдың сынамалары (ішек кесінділері, лимфа түйіндері) культуралдық зерттеу жүргізу үшін мұздатылады немесе глицериннің 30% стерильді ерітіндісімен консервілейді.

Ішектің кесінділерін және лимфа түйіндерін пергаментті қағаздан немесе банкадан жасалған әр түрлі стерильді пакеттерге салады.



ҚР СТ 3504-2019

Ішек кесіндісін гистологиялық зерттеу үшін және лимфа түйіндері формалиннің 10% ерітіндісінде белгіленеді.

Серологиялық зерттеу үшін 5 см³-тен 10 см³-ге дейінгі жыныс тамырынан стерильді пробиркаларға қан алады немесе жануарды сою кезінде алынған қанды пайдаланады.

Іріктелген қан сынамаларынан сарысуды тұндыру әдісімен алады. Қанды ұйыту және сарысуды тұндыру үшін қан бар пробиркалар 20°-ден 30° С-қа дейінгі температурада 30-60 мин, ал одан кейін 4°-ден 10°С-қа дейінгі температурада ұсталады.

Сарысуды карбол қышқылының 5% ерітіндісімен (1 см³ сарысуға 1-2 тамшы) немесе құрғақ бор қышқылымен (сарысудың көлеміне 2% қышқыл) консервілеуге рұқсат етіледі.

Консервіленген сарысулар сынама алынған күннен бастап 6 тәулік ішінде зерттеуге жарамды, консервіленген сарысулар консервіленген күннен бастап 30 тәулік ішінде, оның бастапқы түрі сақталған жағдайда жарамды.

5 Диагностикалау әдістері

Жекелеген клиникалық күдікті жануарда паратуберкулездің болуын диагностикалау үшін бірқатар зертханалық сынақтар қолданылуы мүмкін, оның ішінде: нәжіс жағындылары, нәжіс пен тіндерден алынған өсірінділер, нәжіс немесе тіндерді пайдалана отырып ДНК-зондтар, серология, жануарлардың өлекселерін ашу және гистология.

1-кесте – Паратуберкулезді диагностикалауға арналған сынақ әдістері және олардың мақсаттары

Әдіс	Мақсаты					
	Инфекциядан бос популяция	Орын ауыстыру алдында инфекциядан бос жеке жануарлар	Жою кезінде жәрдемдесу	Клиникалық жағдайларды растау	Инфекцияның таралуы - бақылау	Вакцинациядан кейін жеке жануарлардың немесе популяциялардың иммундық мәртебесі
Агентті сәйкестендіру						
Гистопатология*	+	-	+	+++	-	-
Циль-Нильсон бойынша нәжісті бояу	-	-	-	+	-	-
Өсірінді	+++	+++	+	+++	+	-
ПТР	+	+	+	++	+	-
Иммундық жауапты анықтау						
РИД**	++	-	+	+	+++	+++
ИФТ	++	+	+	+	+++	+++
РСК	-	+	+	+	+	+++
γ –интерферонның босатылуын талдау	-	-	+	-	-	+++
ГЧЗГ	-	-	+	-	-	+++
+++ = ұсынылатын әдіс; ++ = қолайлы әдіс;						

+ = кейбір жағдайларда пайдаланылуы мүмкін, бірақ құны, сенімділігі немесе басқа да факторлар оның қолданылуын айтарлықтай шектейді;
- = бұл мақсатқа сәйкес келмейді;
* = тек өлгеннен кейін пайдалану;
* * = қойлар мен ешкілерде пайдалануға сәйкес келеді.
ПТР = полимеразды тізбекті реакция;
РИД = агар геліндегі иммунодиффузия;
РСК = комплементті бекітуге арналған тест;
ИФТ = иммуноферменттік талдау;
ГЧЗТ = баяу типтегі гиперсезімталдылық

6 Агентті сәйкестендіру

6.1 Жануарлардың өлекселерін ашу

Паратуберкулезді ішекті қалыңдау белгілерінің болуына беттік зерттеу кезінде диагностикалауға болмайды. Ішек шырышты қабықты бөліп алу үшін он екі елі ішектен тік ішекке дейін бөлінуі тиіс. Әрдайым клиникалық белгілердің айқындылығы мен ішектің зақымдану дәрежесі арасында тығыз корреляция жоқ. Ішектің шырышты қабығы, әсіресе мықын ішектің терминалды бөлігі патогенді қалыңдауға және қатпарлануға тексеріледі. Ерте зақымданулар ішекті жарыққа ұстағанда көрініп тұрады, ол кезде жеке түйіртпектерді көруге болады. Шырышты қабықтың гиперемиясы, эрозиялар және нүктелік қан құйылулар паратуберкулезбен ауыратын бұғыларда байқалады. Барынша ерте зақымданулар - лимфа түйіндерінің қалыңдауы мен тығыздалуы. Шажырқайлық лимфа түйіндері әдетте ұлғаяды және ісінеді. Шажырқайлық лимфа түйіндерінің іртікті және/немесе кальцийленген зақымданулары көбіне ешкілерде және аз мөлшерде қойларда байқалады. Зақымданған шырышты қабықтың және лимфа түйіндерінің кесілген беттерінің жағындылары Циль-Нильсен әдісі бойынша боялады және МАР морфологиялық сипаттамасы бар қышқылға төзімді организмдердің болуын микроскопиялық зерттейді. Дегенмен, қышқылға төзімді организмдер барлық жағдайда болмайды. Осылайша, диагноз кейіннен гистологиялық зерттеу үшін ішек қабырғасы мен шажырқайлық лимфа түйіндерінің көптеген сынамаларын фиксаторға (10%-дық физиологиялық ерітінді) жинау арқылы расталады. Гематоксилинмен және эозинмен боялған кесінділерді де, Циль-Нильсенмен боялған кесінділерді де зерттеу керек. Паратуберкулездің типтік зақымданулары ішектің шырышты қабығының, шырышасты қабығының, пейер түйіндіктерінің және шажырқайлық лимфа түйіндері қабатының эпителиоидты жасушалар ретінде белгілі ірі макрофагтармен және әдетте, бірақ әрдайым емес ұйықтар немесе бірлі-жарым орналасқан қышқылға төзімді бациллалар анықталатын көп ядролы алып жасушалармен инфильтрациядан тұрады.

6.2 Бактериология (микроскопия)

Цил-Нильсен әдісімен боялған нәжістің немесе ішектің шырышты қабығының жағындыларын микроскопиялық зерттейді. Егер ұсақ (0,5-1,5 ПМ), қатты қышқылға төзімді микобактериялардың жиналуы (үш немесе одан көп организмдер) анықталған болса, паратуберкулездің болжамды диагнозы қойылуы мүмкін. Бірлі-жарым қышқылға төзімді микобактериялардың болуы түйірлер болмаған жағдайда дәлелсіз нәтижені көрсетеді. Бұл тесттің кемшілігі оның басқа микобактериялардың түрлері арасында сараланбауы болып табылады және жағдайлардың аз ғана үлесі нәжістің бір сынамасын микроскопиялық зерттеу кезінде расталуы мүмкін.

6.3 Бактериология (себу)

6.3.1 Жануардан МАР бөлінуі организмнің ауру жұқтыруының түпкілікті диагнозын қамтамасыз етеді. Себу – жалған оң нәтиже бермейтін жалғыз тест (100% ерекшелігі). Дегенмен, ықтимал көшіру құбылысына байланысты ластанған үй-жайларда инфекцияланбаған жануарлар нәжісінен өсірінділерді тестілеу жалған оң реакцияларға әкелуі теориялық түрде мүмкін болады.

Нәжісті себу тірі жануарларда (зақымданған жануарларда) паратуберкулезді диагностикалаудың алтын стандарты болып саналады. Шын мәнінде, нәжістің микроскопиясы аурудың соңғы сатыларында жануарлардың көпшілігін анықтауға қабілетті, бірақ инфекцияның бастапқы сатыларындағы бірнеше жануарларды ғана сәйкестендіреді, жағдайларға сәйкес нәжіс өсіріндісінің сезімталдылығы зақымданған ірі қара мал үшін 70%, инфекциялық ірі қара мал үшін 74% және инфекцияланған ірі қара мал үшін 23-29%-ды құрайды. МАР үшін ірі қара малдың, қой мен ешкі тіндерінің өсіріндісі гистопатологиялық зерттеуге қарағанда анағұрлым сезімтал.

Себудің бірнеше әдістері бар, олар ортаға және сынама дайындау хаттамаларына байланысты ерекшеленеді. МАР өсіруді әрдайым J микобактериямен толықтырылған арнайы орталарды пайдалану арқылы жүргізеді.

МАР нәжіс пен ішек тіндерінің сынамаларындағы басқа бактериялар немесе зендер санынан едәуір асып түседі. Мұндай сынамалардан МАР-тың сәтті бөлінуі осы жағымсыз организмдердің тиімді белсенуіне байланысты. Зарарсыздандырудың оңтайлы әдісі МАР-тың өсуіне барынша тежеуші әрекет етуі тиіс. Қатерсіздендірудің стандартты хаттамаларының сынамалардан бөлінген МАР организмдерінің санын тиісінше нәжіс пен тіндер үшін шамамен $2,7 \log_{10}$ және $3,1 \log_{10}$ -ға азайтатыны көрсетілген.

Сынамаларды қатерсіздендірудің екі негізгі әдісі бар: зарарсыздандыру үшін қымыздық қышқылын және NaOH, өсу үшін Левенштейн-Йенсен ортасын пайдалану әдісі және зарарсыздандыру үшін жұмыртқа сарысы Херолдас немесе Мидлбрук 7Н10 сияқты қатты орталармен немесе Мидлбрук 7h9 сияқты сұйық орталармен үйлесімде гексадецилпиридиний хлоридін пайдалану әдісі. 7h10 ортасының артықшылығы – ол Херольдс сарыуызымен салыстырғанда қой штамдарының өсуін жақсы қолдайтындығы. Сұйық орталар қой, сондай-ақ бұқа штамдарына арналған қатты орталарға қарағанда анағұрлым сезімтал.

Қатты орталардағы МАР алғашқы колониялары инокуляциядан кейін 5 аптадан 6 айға дейін кез келген уақытта пайда болуы мүмкін. Ерекше ашық сары пигменттелген типтерін қоса алғанда, қой штамдары НЕУМ немесе LJ сияқты әдеттегі пайдаланылатын орталардағы ірі қара малдың штамдарына қарағанда жақсы өседі және бастапқы өсірінділер ұзақ инкубациялаусыз теріс ретінде тасталмауы тиіс. Жұмыртқа сарысы мен микобактерия қосылған Мидлбрук 7h10 қатты ортасы МАР қой штамдарын өсіруге жақсы үйлеседі.

Ірі қара малдағы Херольдс МАР штамының алғашқы колониялары өте ұсақ, дөңес (жартылай шар тәрізді), жұмсақ, мукоидты емес және бастапқыда түссіз және жартылай мөлдір. Колонияның өлшемі бастапқыда нүктелі. Олар 0,25-1 мм шегінде қалуы мүмкін және әдетте колониялар көлбеу қоректік ортада көп болған кезде олар азаяды. Колониялардың шеттері дөңгелек және тегіс, ал олардың беттері тегіс және жылтыр. Колониялар инкубациялануына қарай үлкен, анағұрлым дөңес, мөлдір емес, кремді ақ немесе ашық сарғыш түсте болады. Бұрынғы оқшауланған колониялар 2 мм жетуі мүмкін. Колониялардың морфологиясы жасына қарай тегістен кедір-бұдырға және жартылай сфералықтан бүртік тәріздіге дейін өзгереді.

Түрлендірілген ортада ірі қара мал штамының 7Н10 колониялары Херольдске қарағанда, әсіресе ескі өсірінділерде дөңестігі аз. Олар диаметрінде шамамен 1 мм дейін

тарылған және ашық қоңыр түсті, тек ортаға қарағанда сәл ғана ашық. Херольдстегі ірі қара мал штамдарының колонияларымен салыстырғанда оларды 7h10-да табу қиын. Түрлендірілген 7h10 қой штамының колониялары дөңес, жұмсақ, ылғалды, жылтыр, сұрғылт ақшылдан ашық қоңыр түске дейін және орта түсіне өте ұқсас. Колониялар, әдетте, нүктелер арасында және 0,5 мм болады, бірақ 1 мм-ге және егер бірнеше колониялар көлбеу қоректік ортада кездессе, кейде 1,5 мм-ге жетуі мүмкін.

Сапрофитті микобактериялар кез келген ортада ұқсас болуы мүмкін, бірақ көбіне 5-7 күннен кейін көрінеді.

МАР сәйкестендіру үшін микобактинге тәуелділікті көрсету үшін микобактинмен бір ортада және онсыз күмәнді колониялардың шағын инокуляттарын субкультивациялау қажет. Микобактин организмнің жасушалық қабырғасында болады және ауыр инокулятта микобактин жоқ ортада МАР-тың өсуін қолдау үшін жеткілікті микобактин болуы мүмкін. Бұдан басқа, МАР изоляттарын сәйкестендіруді растау үшін ПТР (таргетинг ИС 900 немесе F57) растауын пайдалану керек.

6.3.2 Орта

Қолайлы ортаға мысалдар мыналар:

а) Микобактинмен Херрольд жұмыртқа сарысы ортасы

1 литр ортаға: 9 г. пептон; 4,5 г. натрий хлориді; 2,7 г. ет сығындысы; 27 мл глицерин; 4,1 г. натрий пируваты; 15,3 г. агар; 2 мг микобактин; 870 мл. тазартылған су; алты жұмыртқа сарысы (120 мл.); және 5,1 мл. 2% малахит жасыл су ерітіндісі қажет. Алғашқы алты ингредиент өлшенеді және тазартылған суда қыздыру кезінде ерітіледі. 4% NaOH ерітіндісін пайдаланып 6.9-7.0 дейін сұйық ортаның рН-ы реттеледі және 7.2 – 7.3 қатты фазаның рН-ын қамтамасыз ету үшін 4 мл этил спиртінде ерітілген микобактин қосылады. 121°C-та 25 минут бойы автоклавтайды. 56°C-қа дейін суытылады және

асептикалық түрде алты стерильді сарысы¹ мен малахит жасыл стерильді ерітіндісі қосылады. Мұқият араластырылып, стерильді тығындарға бөлінеді. 50 мг. хлорамфеникол, 100 000 ЕД пенициллин және 50 мг амфотерицин қосуға жол беріледі.

б) Дубос түрлендірілген ортасы

1 литр ортаға: 2,5 г. казамин қышқылы; 0,3 г. аспарагин; 2,5. сусыз динатрийгидрофосфат; 1 г. калий дигидрофосфаты; 1,5 г. натрий цитраты; 0,6 г. магний кристалды сульфаты; 25 мл. глицерин; 50 мл 1% Твин 80 (Полисорбат 80) ерітіндісі; және 15 г. агар қажет. Әрбір тұзды барынша аз қыздырылған тазартылған суда еріту және 800 мл дейін жеткізу керек. Микобактинді 0,05% спирт ерітіндісіне қосады (2 мг-ды 4 мл. этил спиртінде ерітеді), ортаны 100°C дейін еркін булаумен қыздырады, содан кейін 115°C-та автоклавтаумен 15 минут бойы стерильдейді. Су моншасында 56°C-қа дейін салқындатады, антибиотиктер (100 000 ЕД пенициллин; 50 мг. хлорамфеникол; және 50 мг. амфотерицин В) және сарысу (200 мл. бұқа сарысуын, Seitz «ЕХ» төсемі арқылы стерильденген және 56°C-та 1 сағат бойы жылумен белсендірілген) қосады. Орта мұқият араластырылады, содан кейін стерильді шыны түтіктерге құйылады. Бұл ортаның артықшылығы оның мөлдірлігі болып табылады, бұл колониялардың ерте анықталуын жеңілдетеді.

в) Түрлендірілген Миддлбрук 7Н10 және 7Н9

г) Микобактинмен немесе онсыз Левенштейн-Йенсен ортасы

¹ Антибиотик алмаған құстардан алынған 2 күннен аспаған жаңа жұмыртқаларды пайдаланыңыз. Щетканың көмегімен жұмыртқаны жуғыш затпен сумен жуыңыз. Сумен шайып, жұмыртқаны 70° спиртке 30 минут салыңыз. Екі стерильді сүлгінің арасына салыңыз. Егеуқұйрық тісіне арналған стерильді қысқыштармен жұмыртқа қабығының бір шетін шамамен 10 мм тесік жасап жарыңыз және жұмыртқа ақуызын қысқышпен және гравитациямен алып тастаңыз. Тесікті үлкейтіңіз және сарысын ұсақтаңыз. Жұмыртқа сарысын қысқышты айналдырып араластырыңыз және сары қабын алып тастаңыз. Араластырылған жұмыртқа сарысын ортаға құйыңыз.



ҚР СТ 3504-2019

6.3.2 Сынамаларды дайындау

а) Тіндердің сынамаларын өңдеу

Химиялық консерванттарды пайдалануға жол берілмейді. Тіндер -70°C -та мұздатылуы мүмкін. Ластануды болдырмау үшін нәжіс массалары зертханаға жіберер алдында ішек жолдарының бөліктерінен жуылады.

1) Тіндерді зарарсыздандыру үшін ыдырату/тұндыру әдісі

Мықынбүйен қақпақшасының шамамен 4 г. шырышты қабығын немесе 4 г. шажырқай түйінін араластыру үшін ішінде 50 мл трипсин (2,5%) бар стерильді ыдысқа салады. Қоспаны 4% NaOH және рН қағаздың көмегімен бейтараптыққа жеткізеді және магниттік араластырғышта бөлме температурасында 30 минут бойы араластырады. Пісірілген қоспаны дәкемен сүзеді. Сүзіндіні 30 минут бойы шамамен 2000-3000 г кезінде центрифугалайды. Шөгінді үсті сұйықтығы төгіледі және тастайды. Шөгінді 0,75% НРС-да 20 мл-да ресуспензияланады және бөлме температурасында 18 сағат бойы қозғалмай қалдырылады. Шыны түтіктің түбіне шөгетін бөлшектер инокулят ретінде пайдаланылады және шөгінді үсті сұйықтығын бұзбай тамшуырмен алынады. Балама ретінде 5% қымыздық қышқылымен өңдеу сияқты басқа да зарарсыздандыру әдістерін қолдануға болады.

2) Тіндерді зарарсыздандыру үшін екі рет инкубациялау тәсілі

Шамамен 2 г. тіннің (кесілген майдың) сынамасын скальпельдің стерильді жүзімен немесе қайшымен ұсақтап кеседі және гомогенизаторда 1 минут бойы 25 мл. 0,75% НРС-да гомогенизациялайды. Сынаманы көбік шашырап, тіннің анағұрлым үлкен бөліктері тұнатындай етіп тұндырады. Тіннің гомогенаты майды немесе тіннің ірі бөліктерін тасымалдауды болдырмау үшін центрифугалық шыны түтікке құйылады. 30 минут бойы тұндырады, содан кейін шөгінді үстінен сәл жоғары 10 мл. суспензия көлемі 30 мл шыны түтікке алынады және 37°C -та 3 сағат бойы инкубацияланады. 900 г кезінде 30 минут бойы центрифугалайды, шөгінді үсті сұйықтығын алып тастайды және 1 мл-ден ванкомицин, амфотерицин, налидикс қышқылы бар антибиотиктердің 1 мл. қоспасында түйіршіктер ресуспензияланады. Суспензия ортаның инокуляциясы үшін қолданылады.

3) Қоректік ортаның инокуляциясы және инкубация

Шамамен 0,1 мл. инокулят ішінде микобактин бар Геррольд ортасының үш қиғашының әрқайсысына және микобактинсіз Геррольд ортасының бір кесіндісіне көшіріледі. Инокулят қиғаш бетіне біркелкі бөлінеді. Шыны түтіктерді 37°C -та 1 аптаға жуық мерзімге әлсіз бұралған қақпақтарымен көлбеу күйінде қалдырады. Шыны түтіктер бос ылғал көлбеу учаскелерден буланған кезде тік күйге қайтарылады. Қақпақтарын бұрайды және түтіктерді 37°C -та инкубаторға себеттерге салады.

Херрольд ортасындағы жұмыртқа инокуляттағы қалдық НРС бактерицидтік белсенділігін бейтараптандыру үшін фосфолипидтердің жеткілікті үлесін қосады. Басқа тасығыштарда (түрлендірілген Дубос және Миддлброк ортасы) бұл қасиеттер жоқ. Сынаманы қатерсіздендіру үшін басқа да өңдеу әдістері қолданылуы мүмкін, мысалы, 5% мөлшерде қымыздық қышқылы.

НРС зендер контаминациясының өсуіне кедергі жасауға тиімді болмайды. Амфотерицин В (фунгизон) инокуляцияланған ортада зендердің өсуін тиімді бақылайды. Фунгизон 50 мкг мл. ортаның соңғы концентрациясында Геррольд ортасына қосылуы мүмкін. Зеңге қарсы белсенділіктің жоғалуына байланысты құрамында фунгизон бар Геррольд ортасын сақтау 4°C -та 1 аймен шектелуі тиіс.

Қиғаштарды кемінде 4 ай бойы инкубациялайды және алтыншы аптадан бастап апта сайын бақылайды.

б) Нәжіс сынамасын өңдеу

Химиялық консервант пайдаланылмайды. Нәжіс сынамасын -70°C -та мұздатуға болады.

1) Суспензия және нәжісті зарарсыздандыру

1 г нәжіс ішінде 20 мл. стерильді тазартылған су бар көлемі 50 мл шыны түтікке тасымалданады. Қоспаны бөлме температурасында 30 минут бойы шайқайды. Анағұрлым ірі бөлшектері 30 минут ішінде тұнады. Нәжіс суспензиясының ең жоғарғы 5 мл ішінде 20 мл 0,95% НРС бар көлемі 50 мл шыны түтікке тасымалдайды. Шыны түтіктің біркелкі таралуын қамтамасыз ету үшін оны бірнеше рет айналдырады және бөлме температурасында 18 сағат бойы тұндыруға қалдырады.

2) Қоректік орталардың инокуляциясы

0,1 мл бұзылмаған шөгіндіні Герролд ортасының төрт қиғашының әрқайсысына, үшеуі микобактинмен және біреуі микобактинсіз тасымалдайды. Жағынды шөгіндіден жасалуы және Циль-Нильсен әдісімен боялуы мүмкін.

3) Еңістерді инкубациялау және қадағалау

Тіндердің үлгілеріне арналғанмен бірдей.

7 Серологиялық зерттеулер

Ірі қара малдың паратуберкулезі үшін пайдаланылатын серологиялық тесттер комплементті байланыстыру реакциясы (РСК), иммуноферментті талдау (ИФТ) және агар гелінің иммунодиффузиясы (РИД) болып табылады.

Әр түрлі әдістерде және ИФТ түрлерінде жеткізілетін тест-жүйелердің тест-жүйенің сериясына байланысты жаңартылып, өндірушілермен толықтырылуына байланысты кейбір параметрлер мен процедуралар өзгеруі мүмкін.

7.1 Иммуноферменттік талдау

ИФТ қазіргі уақытта малдағы МАР-қа сарысу антиденелеріне арналған ең сезімтал және спецификалық тест. Оның сезімталдығын клиникалық жағдайлардағы РСК-мен салыстыруға болады, бірақ субклиникалық инфекцияланған тасымалдаушылардағы РСК-ға қарағанда артығырақ. ИФТ спецификалылығы *M. phlei* сарысуларын сіңіру есебінен арттырылады.

ИФТ қатты ортада нәжіс өсіріндісін жұқтырған ретінде сәйкестендірілген ірі қара малдың 30-40%-ға жуығын анықтайды. Өсіру әдістері сияқты ИФТ сезімталдығы нәжісте МАР бөліну деңгейіне және жануарлардың жасына байланысты.

Сіңірілген ИФТ сіңіру сатысының қосымша спецификасы бар ИФТ сезімталдығын камтиды. Тестілеуге жататын сарысуларды тікелей емес ИФТ-да тестілеу басталмас бұрын еритін *M. phlei* антигені буферге қосады. Бұл рәсім спецификалық емес қарама-қарсы әсер ететін антиденелерді жояды.

Микротитр пластиналарының форматы бар, онда МАР антигені 96-ұяшықты пластиналарға жағылады. Сынамалар қарама-қарсы әсер ететін антиденелерді жою үшін құрамында *M. phlei* бар сынамалар еріткішінде араластырылады. Сұйылтылған сынамаларды жабылған ұяшықта инкубациялау кезінде МАР-қа тән антидене жабылған антигендер кешенін түзеді. Ұяшықтардан байланыспаған материалдарды жуғаннан кейін ақжелкек пероксидазасын – таңбаланған бұқаға қарсы иммуноглобулин қосады. Бұл қатты фазалы антигенмен байланысқан иммуноглобулиндермен әрекеттеседі. Субстрат трансформациясының жылдамдығы байланысқан иммуноглобулиннің санына пропорционал. Спектрофотометриялық (пайдаланылатын хромогенге сәйкес келетін толқын ұзындығында) өлшенген кейінгі түс зерттелетін сынамада болатын антиденелер санына пропорционал.

ҚР СТ 3504-2019

7.2 Комплементті байланыстыру реакциялары

7.2.1 РСК ірі қара мал үшін қолданылатын стандартты тест болып табылады. КБР клиникалық күдікті жануарларда жақсы жұмыс істейді, бірақ оны бақылау мақсатында жалпы популяцияда пайдалануға мүмкіндік беру үшін жеткілікті ерекшелігі жоқ.

7.2.2 Аппаратура, материалдар, реактивтер

- Микротитрационные планшеты (96-ұяшықты)
- Көп арналы мөлшерлеуіштер, бір арналы мөлшерлеуіштер, стерильді пластикалық ұштықтар

- Жасушаларды өсіруге арналған орта жасуша жолдарының паспортына сәйкес

- CO₂-инкубатор (37° C)

- *Mycobacterium avium* D9 не болмаса штамм *M. paratuberculosis* 316F

- Қой эритроциттер, 2,5 %,

- Гемолизин

- Кальций-магний верональді буферу

- Зертханалық үйірткі

7.2.3 Сынақ рәсімі

а) Антиген липид (*M. paratuberculosis* 316F штамы) алынып тасталған микобактерияның сулы сығындысы болып табылады. Сондай-ақ *Mycobacterium avium* D9 пайдалануға болады.

б) Барлық сарысуларды 60°С-та 30 минут бойы су моншасында белсендіреді және 1/4, 1/8 және 1/16 араластырылады. Оң бақылау сарысуы және теріс бақылау сарысуы әрбір пластинаға енгізілуі тиіс. Сондай-ақ мынадай бақылау құралдары дайындалады: антигендік бақылау, комплементті бақылау және гемолиздік жүйені бақылау.

в) Қалпына келтірілген, леофилизацияланған комплементті антигенге қарсы титрлеумен есептелгендей құрамында алты есе N₅₀ (гемолиздің 50%-дық дозасы) болуы үшін араластырады.

г) Қойлардың эритроциттері, 2,5%, N₁₀₀ гемолизиннің 2 бірлігімен сенсibiliзацияланады.

д) Барлық ерітінділер мен реагенттер кальций-магний верональды буферде дайындалады, әр реагенттің 25 мл-і 96-ұяшықты түбі дөңгелек микротитрлеу пластиналарында пайдаланылады.

е) Бастапқы инкубация түні бойы 4°С-та және екінші инкубация 30 минут бойы 37°С-та.

ж) Нәтижелерді оқу және түсіндіру: Пластиналарды тұндыру немесе центрифугалау үшін қалдыруға және былайша оқуға болады: 4+ = 100% бекіту, 3+ = 75% бекіту, 2+ = 50% бекіту, 1+ = 25% бекіту және 0 = толық гемолиз. Тест-сарысулардың титрі 50% бекітуді беретін сарысудың барынша сұйылтылуына кері шама ретінде анықталады. 2+ реакциясы 1/8-ге оң болып саналады. Нәтижелер клиникалық белгілерге және басқа да зертханалық деректерге сәйкес түсіндірілуі тиіс.

7.2.3 Комплементті макрометодпен байланыстыру реакциясын қою (екінші нұсқа)

7.2.3.1 Аппаратура, материалдар, реактивтер

- Флоринский сынауықтары

- Су моншасы

Сыналатын тесіктерді антигенмен 1:5 және 1:10 және антигенсіз 1:5 араластырылып зерттейді.

Реакцияны үш сынауыққа қою кезінде бірінші болып 0,4 мл физиологиялық ерітінді құйылады және 0,1 мл сыналатын сарысулар қосылады (1:5 араластыру). Бірінші

пробиркадан 0,2 мл екінші пробиркаға және 0,1 мл – үшінші пробиркаға ауыстырылады, содан кейін 0,1 мл физиологиялық ерітінді қосылады (1:10 араластыру).

Сұйылтылған сарысуларды инактивациялау 30 минут мал түріне байланысты температура өзгереді. Инактивациялаудан кейін 2,3 қатарға 0,2 мл антиген және комплементтің барлық пробиркаларына 0,2 мл-ден енгізеді. Инактивация уақыты өткеннен кейін 0,4 мл гемолитикалық жүйе енгізіледі. 37° - ден 38°C температурада 20 минут инактивацияға су моншасына қойылады. Реакцияны есепке алу су моншасынан штативтерді алып шыққаннан кейін бірінші оқу - визуалды, екінші оқу 3-4 сағаттан кейін, эритроциттер оң сарысуымен бақылау сынамаларында сынауықтың түбіне немесе келесі күні отырғызылған кезде жүргізіледі.

7.3 Агар геліндегі иммунодиффузия реакциясы

РИД клиникалық күдікті ірі қара мал, қой және ешкінің ауруын растау үшін пайдалы.

Қолданылатын антиген жасушалық фракциялаудың гидравликалық пресінде жасушаларды бұзу арқылы алынған *M. avium* 18 (формальды түрде *M. paratuberculosis* 18) зертханалық штамының тазартылмаған протоплазмалық сығындысы болып табылады. Бұзылған жасушалар жасушалық қабырғаның қалдықтарын жою үшін 40 000 г-да 2 сағат бойы үйірткіленеді, ал шөгінді үсті сұйықтығын ұстап, лиофилизациялайды. Бұл антигенді 10 мг/мл концентрациясында суда араластырады.

Агарозды 0,75% агарозаның соңғы концентрациясын ала отырып, құрамында натрий азиді бар, рН 8,6 барбитальды буферде ерітеді. Агарозаны Петри шыныаяғына немесе заттық шыныға құюға болады. Ұяшықтар алты бұрышты схемада кесілген. Ұяшықтардың диаметрі 4 мм, қашықтығы 4 мм, ал агардың тереңдігі 3-4 мм болуы тиіс. антиген орталық ұяшықтарға қосылады. Тестіленетін, оң және теріс бақылау сарысулары балама перифериялық ұяшықтарға қосылады.

Пластиналар бөлме температурасында ылғалды камерада инкубацияланады. Гельдерді тұндыру сызығында 24 және 48 сағат инкубациялаудан кейін зерттейді. 48 сағатқа дейін немесе одан кейін оң бақылау сарысуымен бірдей бір немесе одан да айқын анықталған тұндыру сызықтарының пайда болуы оң тест нәтижесі болып табылады. Қандай да бір шөгінді сызығының болмауы тесттің теріс нәтижесі ретінде тіркеледі. Спецификалық емес желілер болуы мүмкін.

Әдістің бірнеше нұсқасы пайдаланылады.

8 Жасушалық-жанама иммунитетке сынау

8.1 Жүйелік жасушалық-жанама жауапты анықтау антиденелер өнімін анықтаудың алдында болады. Ең аз инфекцияланған жануарлар көбіне серологиялық тестілеуге жауап бермейді, бірақ жасушалық-жанама иммунитетті (ЖЖИ) өлшейтін тесттерге оң жауап беруі мүмкін. Инфекцияланған популяцияларда жануарлардың анағұрлым көп саны антиденелерге арналған тесттермен салыстырғанда ЖЖИ-ге арналған тесттерге жауап береді деп күтіледі, себебі ЖЖИ әсер етуді көрсетеді, ал антиденелер инфекцияның прогресін көрсетеді.

8.2 Гамма-интерферонның босатылуын талдау

Талдау гамма-интерферонның сенсбилизацияланған лимфоциттерден 18-36-сағаттық инкубациялық кезең ішінде спецификалық антигенмен ([PPD] құс туберкулинінің тазартылған ақуыз туындысы, бұқа туберкулинінің PPD немесе



ҚР СТ 3504-2019

джонинмен) босап шығуына негізделген. Бұқа гамма-интерферонын сандық анықтау бұқа гамма-интерферонды екі моноклонды антидене пайдаланылатын сэндвич-ИФТ көмегімен жүзеге асырылады. Ірі қара малдың туберкулезін диагностикалау үшін гамма-интерферонды анықтауға негізделген коммерциялық диагностикалық тест әзірленген. Әдіс және қажетті сынақ материалдары коммерциялық жиынтыққа қоса берілетін нұсқаулықтарда толық сипатталған.

8.2 Баяу типтегі асқын сезімталдылық

Баяу типтегі асқын сезімталдылыққа арналған тері тесті (ГЗТ) жасушалық иммунитеттің өлшемі болып табылады, бірақ маңызы шектеулі. Тест қырқылған немесе қырылған жерге, әдетте мойынның ортаңғы үштен бір бөлігі жағынан антигеннің 0,1 мл тері ішіне инокуляция жолымен жүргізіледі.

Терінің қалыңдығы штангенциркульдің көмегімен егуден кейін 72 сағат бұрын және одан кейін өлшенеді. Тері қалыңдығының 2 мм астам ұлғаюын ГЗТ-ның болуын көрсету ретінде қарастыру керек. Бұғыларда оң реакциялардың дискретті шектеулі ісіктер түрінде емес, диффузды түйіртпек түрінде болуы мүмкін екенін атап өткен жөн, бұл тестті оқуды қиындатады. Осы түрде кез келген ісінудің болуын оң нәтиже ретінде қарастыру керек. Алайда *M. avium* кешеніне сенсбилизация жануарлар арасында кең таралған және құс туберкулині де, джонин де жоғары спецификалық болып табылмайды. Бұдан басқа тері тесттерінің нәтижелерін түсіндіру критерийлеріне қатысты келісімнің болмауымен күрделене түседі.

ӘОЖ 636.2

МСЖ 65.020.30 (NEQ)

Түйін сөздер: паратуберкулез, Джон ауруы, зертханалық әдістер, сынақ хаттамасы, агентті сәйкестендіру, серологиялық тест.



НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Животные

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА

СТ РК 3504-2019

(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, NEQ)

Издание официальное

**Комитет технического регулирования и метрологии
Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан
(Госстандарт)**

Нур-Султан



Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН ТОО «Elit Art»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от 11 декабря 2019 г. № 457-од.

3 Настоящий стандарт разработан с учетом Руководство Международного эпизоотического бюро «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals» (Животные. Методы лабораторной диагностики паратуберкулеза глава 3.1.15)

Степень соответствия – неэквивалентная (NEQ).

Перевод с английского языка - (en).

4 В настоящем стандарте реализованы положения Законов Республики Казахстан: «О стандартизации» от 5 октября 2018 года № 183-VI, «О ветеринарии» от 10 июля 2002 года № 339.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Нормативные 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.



Введение

Паратуберкулез (болезнь Ионе) - хронический энтерит жвачных животных, вызываемый *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). Паратуберкулез чаще всего встречается у домашних жвачных (коров, овец, коз, верблюдов и буйволов), а также диких жвачных (оленьевых) и имеет глобальное распространение. Болезнь также была зарегистрирована у лошадей, свиней, кроликов, горностаев, лисиц и ласк. В естественных условиях заболевание крупного рогатого скота распространяется при попадании в организм MAP из контаминированной внешней среды. Идентификация MAP основана на его потребности в микобактине и на его связи с клиническими признаками и определенными лабораторными данными, такими как результаты культивирования и ПЦР. Клиническими признаками паратуберкулеза являются медленно прогрессирующее истощение и диарея, которая сначала носит прерывистый характер, постепенно становясь все более тяжелой, пока не становится постоянной у крупного рогатого скота. Ранние поражения возникают в стенках тонкой кишки и брыжеечных лимфатических узлах, и инфекция ограничивается этими участками на этой стадии. По мере прогрессирования заболевания крупные поражения возникают в подвздошной кишке, тощей кишке, терминальной части тонкой кишки, слепой кишке и толстой кишке, а также в брыжеечных лимфатических узлах. MAP присутствует в очагах поражения и, в итоге, по всему телу. Кишечные поражения ответственны за утечку белка и синдром мальабсорбции белка, которые приводят к истощению мышц. Клинические признаки обычно впервые появляются в молодом возрасте, но заболевание может возникнуть у животных в любом возрасте старше 1-2 лет, а у молочного скота чаще всего отмечается у 3-5-летней возрастной группы.

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3504-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан



НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**Животные****МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА**

Дата введения 2020-07-01

1 Область применения

- Настоящий стандарт распространяется на методы лабораторной диагностики паратуберкулеза:

- бактериологический метод;
- вирусологические методы (гамма-интерферон, гиперчувствительность замедленного типа (кожная проба));
- гистологический метод;
- метод ПЦР;
- серологические методы (ИФА, РСК, РИД).

2 Сокращения**Микромоль; мкМ****Микролитр; мкл****Моль; М****Миллиграмм; мг****Нитроцеллюлозная мембрана; НЦМ****Полимеразной цепная реакция; ПЦР****Иммуноферментный анализ; ИФА****Реакция связывания комплимента; РСК****Реакция иммунодиффузии в агаровом геле; РИД****3 Общие положения**

3.1 Диагностика паратуберкулеза заключается в выделении возбудителя на культуре и его идентификации в одной из реакций.

3.2. Диагноз на паратуберкулез устанавливают на основании результатов исследования, анализа эпизоотологических и клинических данных, а также патологоанатомических изменений.

4 Отбор и подготовка проб

Для бактериоскопического исследования от живых животных отбирается не менее 10 см³ фекалий и соскобы слизистой оболочки прямой кишки.

От павших или убитых животных отбирается не менее трех-пяти различных участков подвздошной кишки, два-четыре брыжеечных лимфатических узла, кусочек илеоцекальной заслонки с прилегающим лимфатическим узлом. При отборе патологического материала прежде всего берут измененные участки кишечника с утолщением, выраженной складчатостью слизистой оболочки и увеличенные лимфатические узлы.

Пробы патологического материала (отрезки кишечника, лимфатические узлы) для проведения культурального исследования замораживают или консервируют стерильным

СТ РК 3504-2019

30 %-ным раствором глицерина.

Отрезки кишечника и лимфатические узлы помещают в разные стерильные пакеты из пергаментной бумаги или банки.

Для гистологического исследования отрезки кишечника и лимфатические узлы фиксируют в 10%-ном растворе формалина.

Для серологического исследования берут из яремной вены от 5 до 10 см³ крови в стерильные пробирки или используют кровь, полученную при убое животного.

Из отобранных проб крови получают сыворотку методом отстаивания. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживаются 30—60 мин при температуре от 20° до 30° С, а затем при температуре от 4° до 10°С. Сыворотка крови должна быть прозрачной, без признаков гемолиза.

Допускается консервировать сыворотку 5%-ным раствором карболовой кислоты (1—2 капли на 1 см³ сыворотки) или сухой борной кислотой (2% кислоты к объему сыворотки).

Неконсервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 6 суток со дня взятия пробы, сыворотки консервированные — в течение 30 суток со дня консервирования при условии сохранения ее первоначального вида.

5 Методы диагностики

Для диагностики наличия паратуберкулеза у отдельного клинически подозрительного животного может быть использован ряд лабораторных испытаний, в том числе: мазки фекалий, культуры из фекалий и тканей, ДНК-зонды с использованием фекалий или тканей, серология, вскрытие трупов животных и гистология.

Таблица 1 – Методы испытаний для диагностики паратуберкулеза и их цели

Метод	Цель					
	Популяция свободная от инфекции	Индивидуальные животные свободные от инфекции перед перемещением	Содействие при ликвидации	Подтверждение клинических случаев	Распространенность инфекции - наблюдение	Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация агента						
Гистопатология*	+	-	+	+++	-	-
Окрашивание фекалий по Циль-Нильсону	-	-	-	+	-	-
Культивирование	+++	+++	+	+++	+	-
ПЦР	+	+	+	++	+	-
Обнаружение иммунного ответа						
РИД	++	-	+	+	+++	+++
ИФА	++	+	+	+	+++	+++
РСК	-	+	+	+	+	+++
Анализ высвобождения γ-интерферона	-	-	+	-	-	+++
ГЧЗТ	-	-	+	-	-	+++
+++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод;						

+ = может использоваться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы серьезно ограничивают его применение;
- = не подходит для этой цели;
* = только посмертное использование;
* * = подходит для использования в овцах и козах.
ПЦР = полимеразная цепная реакция;
РИД = реакция иммунодиффузия в агаровом геле
РСК = реакция связывания комплимента;
ИФА = иммуноферментный анализ;
ГЧЗТ = гиперчувствительность замедленного типа.

6 Идентификация агента

6.1 Вскрытие трупов животных

Паратуберкулез не может быть диагностирован при поверхностном исследовании кишечника на наличие признаков утолщения. Кишечник должен быть отделен от двенадцатиперстной кишки до прямой кишки для выделения слизистой оболочки. Не всегда есть тесная корреляция между выраженностью клинических признаков и степенью поражения кишечника. Слизистая оболочка, особенно терминальной части подвздошной кишки, проверяется на патогномичное утолщение и гофрирование. Ранние поражения видны при удерживании кишечника на свету, когда можно увидеть отдельные бляшки. Гиперемия слизистой оболочки, эрозии и петехиальные кровоизлияния наблюдаются у оленей с паратуберкулезом. Самые ранние поражения - утолщение и уплотнение лимфатических узлов. Брыжеечные лимфатические узлы обычно увеличены и отечны. Казеозные и/или кальцифицированные поражения брыжеечных лимфатических узлов часто наблюдаются у коз и в меньшей степени у овец. Мазки с пораженной слизистой и срезанных поверхностей лимфатических узлов окрашиваются по методу Циля-Нильсена и микроскопически исследуются на наличие кислотоустойчивых организмов, обладающих морфологическими характеристиками МАР. Однако, кислотоустойчивые организмы присутствуют не во всех случаях. Таким образом, диагноз лучше всего подтверждается сбором множественных проб кишечной стенки и брыжеечных лимфатических узлов в фиксатор (10%-ный физиологический раствор) для последующего гистологического исследования. Следует исследовать как окрашенные гематоксилином и эозином срезы, так и срезы, окрашенные методом Циля-Нильсена. Типичные поражения паратуберкулеза состоят из инфильтрации слизистой оболочки кишечника, подслизистой оболочки, пейеровых бляшек и коры брыжеечных лимфатических узлов крупными макрофагами, также известными как эпителиоидные клетки, и многоядерными гигантскими клетками, в которых обычно, но не всегда, обнаруживаются сгустки или единично расположенные кислотоустойчивые бациллы.

6.2 Бактериология (микроскопия)

Окрашенные методом Циля-Нильсена мазки фекалий или слизистой оболочки кишечника исследуются микроскопически. Предполагаемый диагноз паратуберкулеза может быть поставлен, если обнаружены скопления (три или более организмов) мелких (0,5-1,5 мкм), сильно кислотоустойчивых микобактерий. Наличие единичных кислотоустойчивых микобактерий при отсутствии комков указывает на неубедительный результат. Недостатком этого теста является то, что он не дифференцируется среди других видов микобактерий и только небольшая доля случаев может быть подтверждена при микроскопическом исследовании одной пробы фекалий.

6.3 Бактериология (посев)

6.3.1 Выделение МАР от животного обеспечивает окончательный диагноз заражения организмом. Посев является единственным тестом, не дающим ложноположительных результатов (100% специфичность). Тем не менее, из-за потенциального явления переноса, теоретически возможно, что тестирование культур из фекалий неинфицированных животных в загрязненных помещениях может привести к ложноположительным реакциям.

Посев фекалий считается золотым стандартом диагностики паратуберкулеза у живых животных (пораженных животных). Микроскопия фекалий способна выявлять большинство животных на поздних стадиях заболевания, но идентифицирует только отдельных животных на ранних стадиях инфекции. В соответствии с условиями чувствительность фекальной культуры составляет 70 % для пораженного крупного рогатого скота, 74 % для контагиозного крупного рогатого скота и 23-29 % для инфицированного крупного рогатого скота. Культура тканей крупного рогатого скота, овец и козлов для МАР более чувствительна, чем гистопатологическое исследование.

Существует несколько методов посева, которые различаются в зависимости от среды и протоколов подготовки проб. Культивирование МАР всегда проводится с использованием специальных сред, дополненных микобактерином J.

МАР значительно превосходят численностью другие бактерии или грибы в пробах фекалий и кишечных тканей. Успешное выделение МАР из таких проб зависит от эффективной инактивации этих нежелательных организмов. Оптимальный метод обеззараживания должен оказывать наименьшее тормозящее действие на рост МАР. Было показано, что стандартные протоколы дезактивации уменьшают количество организмов МАР, выделенных из проб, примерно на $2,7 \log_{10}$ и $3,1 \log_{10}$ для фекалий и тканей, соответственно.

Есть два основных метода дезактивации проб: метод с использованием щавелевой кислоты и NaOH для обеззараживания и среды Левенштейна-Йенсена для роста, и метод с использованием хлорид гексадецилпирида для обеззараживания в сочетании с твердыми средами, такими как яичный желток Херолдаса или Мидлбрук 7Н10 и жидких сред, таких как Мидлбрук 7Н9. Преимущество среды 7Н10 заключается в том, что она лучше поддерживает рост овечьих штаммов по сравнению с желточной средой Херольдса. Жидкие среды более чувствительны, чем твердые среды, как для овечьих, так и для бычьих штаммов.

Первичные колонии МАР на твердых средах могут появиться в любое время от 5 недель до 6 месяцев после инокуляции. Штаммы овец, включая нетипичные ярко-желтые пигментированные типы, растут менее хорошо, чем штаммы крупного рогатого скота на обычно используемых средах, таких как желточная среда Херольдса или среда Левенштейна-Йенсена, и первичные культуры не должны отбрасываться как отрицательные без длительной инкубации. Твердая среда Миддлбрука 7Н10 с добавлением яичного желтка и микобактерина отлично подходит для культивирования овечьих штаммов МАР.

Первичные колонии крупного рогатого скота штамма МАР на желточной среде Херольдса очень мелкие, выпуклые (полусферические), мягкие, немуккоидные и первоначально бесцветные и полупрозрачные. Размер колонии изначально точечный. Они могут оставаться в пределах от 0,25 до 1 мм. и остаются небольшими, когда колонии многочисленны на скошенной питательной среде. Края колоний округлые и ровные, а их поверхности гладкие и блестящие. Колонии становятся больше, более выпуклыми, непрозрачными, кремово-белыми или ярко-бежевыми по мере инкубации. Более старые изолированные колонии могут достигать 2 мм. Морфология колоний изменяется с

возрастом от гладкой до грубой и от полусферической до сосочковидной

На модифицированной среде 7Н10 колонии штамма крупного рогатого скота менее выпуклые, чем на желточной среде Херольдса, особенно в старых культурах. Они сужены до примерно 1 мм в диаметре и светло-коричневого цвета, только немного светлее, чем среда. По сравнению с колониями штаммов крупного рогатого скота на желточной среде Херольдса, их на 7Н10 труднее обнаружить. Колонии овечьего штамма МАР на модифицированном 7Н10 выпуклые, мягкие, влажные, блестящие, от серовато-белого до светло-коричневого цвета и очень похожи на цвет среды. Колонии, как правило, находятся между точками и 0,5 мм, но могут достигать 1 мм, и редко 1,5 мм, если несколько колоний встречаются на скошенной питательной среде.

Сапрофитные микобактерии могут иметь схожий вид на любой среде, но часто проявляются через 5-7 дней.

Для идентификации МАР необходимо субкультивировать небольшие инокуляты подозрительных колоний на одной среде с микобактином и без него, чтобы продемонстрировать зависимость от микобактина. Микобактин присутствует в клеточной стенке организма, и тяжелый инокулят может содержать достаточно микобактина для поддержки роста МАР на среде, которая не содержит микобактина. Кроме того, для подтверждения идентификации изолятов МАР следует использовать подтверждение ПЦР (таргетинг ИС 900 или F57).

6.3.2 Среда

Примерами подходящей среды являются:

а) Среда яичного желтка Херрольда с микобактином

На 1 литр среды требуется: 9 г пептона; 4,5 г хлорида натрия; 2,7 г мясного экстракта; 27 мл глицерина; 4,1 г пирувата натрия; 15,3 г агара; 2 мг микобактина; 870 мл дистиллированной воды; шесть яичных желтков (120 мл); и 5,1 мл 2 % водного раствора малахитовой зелени. Отмеряются первые шесть ингредиентов и растворяются при нагревании в дистиллированной воде. Регулируется рН жидкой среды до 7.0 с использованием 4 % раствора NaOH, и тестируется для обеспечения рН твердой фазы от 7.2 до 7.3 Добавляется микобактин, растворенный в 4 мл этилового спирта. Автоклавируются при 121° С в течение 25 минут. Остужается до 56° С и асептически добавляются шесть стерильных желтков¹ и стерильный раствор малахитовой зелени. Аккуратно смешивается и распределяется в стерильные пробки. Допускается добавление 50 мг хлорамфеникола, 100 000 ЕД пенициллина и 50 мг Амфотерицина В.

б) Модифицированная среда Дубоса

На 1 литр среды требуется: 2,5 г казаминовой кислоты; 0,3 г. аспарагина; 2,5. безводного динатрийгидрофосфата; 1 г дигидрофосфата калия; 1,5 г. цитрата натрия; 0,6 г кристаллического сульфата магния; 25 мл глицерина; 50 мл 1 % раствора Твина 80 (Полисорбата 80); и 15 г агара. Каждую соль растворяется в дистиллированной воде с минимальным нагревом и доводится до 800 мл. Добавляется микобактин в спиртовой раствор 0,05 % (2 мг растворяется в 4 мл этилового спирта), нагревается среда до 100° С свободным пропариванием, а затем стерилизуется автоклавированием при 115°С в течение 15 минут. Охлаждается до 56° С на водяной бане, добавляются антибиотики (100 000 ЕД пенициллина; 50 мг хлорамфеникола; и 50 мг Амфотерицина В) и сыворотка (200 мл. бычьей сыворотки, стерилизованной фильтрованием через прокладку Seitz «EX» и

¹ Используйте свежие яйца не старше 2 дней от птиц, не получавших антибиотики. С помощью щетки, яйца промойте водой, содержащей моющее средство, с помощью щетки. Смойте водой и поместите яйца в 70° спирта в течение 30 минут. Высушите, вставив между двумя стерильными полотенцами. Стерильным пинцетом расколите один конец яичной скорлупы, сделав отверстие приблизительно 10 мм, и удалите яичный белок щипцами и гравитацией. Сделайте отверстие больше и разбейте желток. Смешайте яичный желток, вращая щипцы, и удалите желточный мешок. Вылейте смешанный яичный желток в среду.

СТ РК 3504-2019

инактивированной теплом при 56° С в течение 1 часа). Среда тщательно перемешивается, а затем разливается в стерильные пробирки. Преимуществом этой среды является её прозрачность, что облегчает раннее обнаружение колоний.

- в) Модифицированный Миддлбрук 7Н10 и 7Н9
- г) Среда Левенштейна-Йенсена с микобактерином или без него

6.3.3 Подготовка проб

- а) Обработка проб тканей

Не допускается использование химических консервантов. Ткани могут быть заморожены при минус 70° С. Во избежание загрязнения, фекальные массы промываются от частей кишечного тракта перед направлением в лабораторию.

- 1) Метод расщепления/осаждения для обеззараживания тканей

Приблизительно 4 г слизистой оболочки из илеоцекального клапана или 4 г брыжеечного узла помещается в стерильный сосуд для смешивания, содержащий 50 мл трипсина (2,5 %). Смесь доводится до нейтральности с помощью 4 % NaOH и pH бумаги и перемешивается в течение 30 минут при комнатной температуре на магнитном смесителе. Переваренная смесь процеживается через марлю. Фильтрат центрифугируется примерно при 2000-3000 g в течение 30 минут. Надосадочная жидкость сливается и отбрасывается. Осадок ресуспендируется в 20 мл 0,75 % хлорида гексадецилпиридина и оставляется стоять нетронутым в течение 18 часов при комнатной температуре. Частицы, которые оседают на дно пробирки, используются в качестве инокулята и удаляются пипеткой без нарушения надосадочной жидкости. В качестве альтернативы можно использовать другие методы обеззараживания, такие как обработка 5 % щавелевой кислотой.

- 2) Способ двойной инкубации для обеззараживания тканей

Около 2 г. пробы ткани (обрезанного жира) мелко нарезается стерильным лезвием скальпеля или ножницами и гомогенизируются в гомогенизаторе в течение 1 минуты в 25 мл 0,75 % хлорид гексадецилпиридина. Проба отстаивается так, чтобы пена рассеялась и осели более крупные кусочки ткани. Гомогенат ткани наливается в центрифужную пробирку, чтобы избежать переноса жира или крупных кусочков ткани. Отстаивается в течение 30 минут, затем отбирается 10 мл суспензии чуть выше осадка в пробирку объемом 30 мл и инкубируется в течение 3 часов при 37° С. Центрифугируется в течение 30 минут при 900 g, отбрасывается надосадочная жидкость и ресуспендируются гранулы в 1 мл смеси антибиотиков, содержащей по 100 мг ванкомицина, амфотерицина и налидиксовой кислоты. Инкубируется в течение ночи при 37° С. Суспензия используется для инокуляции среды.

- 3) Инокуляции питательных сред и инкубация

Приблизительно 0,1 мл инокулята переносится на каждый из трех сколов среды Геррольда, содержащей микобактерин, и на один срез среды Геррольда без микобактерина. Инокулят равномерно распределяется по поверхности сколов. Пробирки оставляются в наклонном положении при 37° С на срок около 1 недели с ослабленными закручивающимися крышками. Пробирки возвращаются в вертикальное положение, когда свободная влага испаряется с наклонных участков. Крышки затягиваются и трубки помещаются в корзины в инкубаторе при 37° С.

Яйцо в среде Херрольда вносит достаточный вклад фосфолипидов для нейтрализации бактерицидной активности остаточного хлорида гексадецилпиридина в инокуляте. Другие носители (модифицированные среды Дубоса и Миддлброка) не имеют этого свойства. Для дезактивации пробы могут быть использованы другие методы обработки, например, щавелевая кислота в количестве 5 %.

Хлорид гексадецилпиридина является неэффективным в препятствии росту контаминации грибками. Амфотерицин В (фунгизон) эффективно контролирует разрастание грибков в инокулированной среде. Фунгизон может быть включен в среду

Герольда в конечной концентрации 50 мкг на мл. среды. Из-за потери противогрибковой активности хранение среды Герролда, содержащей фунгизон, должно быть ограничено 1 месяцем при 4° С.

Скосы инкубируют в течение не менее 4 месяцев и наблюдаются еженедельно, начиная с шестой недели.

б) Обработка проб кала

Никакой химический консервант не используется. Пробы фекалий могут быть заморожены при минус 70° С.

1) Суспензия и обеззараживание фекалий

1 г фекалий переносится в пробирку объемом 50 мл, содержащую 20 мл стерильной дистиллированной воды. Смесь встряхивается в течение 30 минут при комнатной температуре. Более крупные частицы оседают в течение 30 минут. Самые верхние 5 мл суспензии фекалий переносят в пробирку объемом 50 мл, содержащую 20 мл 0,95 % хлорид гексадецилпиридина. Пробирка переворачивается несколько раз для обеспечения равномерного распределения и оставляется отстаиваться в течение 18 часов при комнатной температуре.

2) Инокуляция питательных сред

0,1 мл ненарушенного осадка переносится в каждый из четырех скосов среды Герролда, три с микобактерином и один без микобактерина. Мазок может быть сделан из осадка и окрашен методом Циля-Нильсена.

3) Инкубация и наблюдение уклонов

То же, что и для проб тканей.

7 Серологические исследования

Серологическими тестами, используемые для паратуберкулеза крупного рогатого скота, являются реакция связывания комплемента (РСК), иммуноферментным анализом (ИФА) и реакция иммунодиффузии агарового геля (РИД).

В различных методах и видах ИФА могут меняться некоторые параметры и процедуры, ввиду того, что поставляемые тест-системы обновляются и дополняются производителями в зависимости от серии тест-системы.

7.1 Иммуноферментный анализ

ИФА, в настоящее время, самый чувствительный и специфический тест для антител сыворотки к МАР крупного рогатого скота. Его чувствительность сравнима с таковой у РСК в клинических случаях, но больше, чем у РСК у субклинически инфицированных носителей. Специфичность ИФА повышается за счет поглощения *M. phlei* адсорбированных сывороток.

ИФА обнаруживает около 30-40 % крупного рогатого скота, идентифицированного как инфицированный культурой фекалий на твердой среде. Как и методы культивирования, чувствительность ИФА зависит от уровня выделения МАР в фекалиях и возраста животных.

Поглощенная ИФА совмещает в себе чувствительность ИФА с дополнительной спецификой стадии поглощения. Сыворотки, подлежащие тестированию, перед тестированием в непрямом ИФА разбавляют буфером, содержащим растворимый антиген *M. phlei*. Эта процедура устраняет неспецифические перекрестно реагирующие антитела.

Существует формат пластин микротитра, в котором антиген МАР наносится на 96-луночные пластины. Пробы разбавляются в растворителе проб, содержащем *M. phlei*, для удаления перекрестно реагирующих антител. При инкубации разбавленной пробы в

СТ РК 3504-2019

покрытой лунке антитело, специфичное к MAP, образует комплекс с покрытыми антигенами. После вымывания несвязанных материалов из лунок добавляют пероксидазу хрена - меченый анти-бычий иммуноглобулин. Он реагирует с иммуноглобулинами, связанными с твердофазным антигеном. Скорость трансформации субстрата пропорциональна количеству связанного иммуноглобулина. Последующий цвет, измеренный спектрофотометрически (на длине волны, соответствующей используемому хромогену), пропорционален количеству антител, присутствующих в исследуемой пробе.

7.2 Реакции связывания комплемента

7.2.1 РСК является стандартным тестом, используемым для крупного рогатого скота. РСК хорошо работает на клинически подозрительных животных, но не имеет достаточной специфичности, чтобы позволить его использование в общей популяции в целях контроля.

7.2.2 Аппаратура, материалы, реактивы

- Микротитрационные планшеты (96-луночные)
- Многоканальные дозаторы, одноканальные дозаторы, стерильные пластиковые наконечники

- Среда для культивирования клеток согласно паспорту клеточной линии

- CO₂-инкубатор (37° С)

- *Mycobacterium avium* D9 либо штамм *M. paratuberculosis* 316F

- Эритроциты овец, 2,5 %,

- Гемолизин

- Кальциево-магниевом верональном буфер

- Лабораторная центрифуга

7.2.3 Процедура испытания

а) Антиген представляет собой водный экстракт микобактерий, из которых удален липид (штамм *M. paratuberculosis* 316F). Можно также использовать *Mycobacterium avium* D9.

б) Все сыворотки инактивируются на водяной бане при 60° С в течение 30 минут и разбавляются на 1/4, 1/8 и 1/16. Положительная контрольная сыворотка и отрицательная контрольная сыворотка должны быть включены в каждую пластину. Также готовятся следующие средства контроля: антигенный контроль, контроль комплемента и контроль гемолитической системы.

в) Восстановленный, леофилизированный комплемент разбавляются, чтобы он содержал шестикратно H₅₀ (50 %-ная доза гемолиза), как рассчитано титрованием против антигена.

г) Эритроциты овец, 2,5 %, сенсibiliзируются 2 единицами гемолизина H₁₀₀.

д) Все разведения и реагенты готовятся в кальциево-магниевом верональном буфере, 25 мл каждого реагента используются в 96-луночных круглодонных микротитрационных пластинах.

е) Проводится первичная инкубация при 4° С в течение ночи и вторичная инкубация при 37° С в течение 30 минут.

ж) Чтение и интерпретация результатов: Пластины можно оставить для осаждения или центрифугирования и читать следующим образом: 4+ = 100% фиксация, 3+ = 75 % фиксация, 2+ = 50 % фиксация, 1 + = 25 % фиксация и 0 = полный гемолиз. Титр тест-сывороток определяется как величина, обратная наибольшему разведению сыворотки, дающая 50 % фиксации. Реакция 2+ на 1/8 считается положительной. Результаты должны интерпретироваться в соответствии с клиническими признаками и другими лабораторными данными.

7.2.3 Постановка реакции связывания комплемента макрометодом (второй вариант)

7.2.3.1 Аппаратура, материалы, реактивы

- Пробирки Флоринского
- Водяная баня

Испытуемые сыворотки исследуют в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном и 1:5 без антигена.

При постановке реакции в трех пробирках в первую наливается 0,4 мл физиологического раствора и добавляется 0,1 мл испытуемой сыворотки (разведение 1:5). Из первой пробирки 0,2 мл переносится во вторую пробирку и 0,1 мл – в третью, в которую затем добавляется 0,1 мл физиологического раствора (разведение 1:10).

Инактивирование разведенных сывороток проводят 30 минут температура зависимости от вида животных меняется. После инактивирования вносят в 2,3 ряд по 0,2 мл Антигена и во все пробирки Комплекента по 0,2 мл. Инактивируется при температуре от 37° до 38° С в течение 20 минут. По истечению времени инактивации вносится по 0,4 мл гемолитическая система. Ставится в водяную баню на инактивацию 20 минут при температуре от 37° до 38°С. Учет реакции проводят визуально – первая читка после иввлечения штативов из водяной бани, вторая читка через 3-4 часа, когда в контрольных пробах с позитивной сывороткой эритроциты оседают на дно пробирки или на следующий день.

7.3 Реакция иммунодиффузии в агаровом геле

РИД полезен для подтверждения заболевания у клинически подозрительного крупного рогатого скота, овец и коз.

Используемый антиген представляет собой неочищенный протоплазматический экстракт лабораторного штамма *M. avium* 18 (формально *M. paratuberculosis* 18), полученный путем разрушения клеток в гидравлическом прессе клеточного фракционирования. Разрушенные клетки центрифугируются при 40 000 g в течение 2 часов для удаления остатков клеточной стенки, а надосадочная жидкость удерживается и лиофилизуется. Этот антиген размешивается в воде в концентрации 10 мг/мл.

Агароза растворяется в барбитальном буфере, рН 8,6, содержащем азид натрия, с получением конечной концентрации агарозы 0,75 %. Агарозу можно разливать в чашки Петри или на предметные стекла. Лунки вырезаны в шестиугольной схеме. Лунки имеют диаметр 4 мм, расстояние 4 м, а глубина агара должна быть от 3 до 4 мм Антиген добавляется в центральные лунки. Тестируемые, положительные и отрицательные контрольные сыворотки добавляются в альтернативные периферийные лунки.

Пластины инкубируются во влажной камере при комнатной температуре. Гели исследуются на линии осаждения после 24 и 48 часов инкубации. Появление одной или более четко определенных линий осаждения, которые идентичны контрольной положительной сыворотке, до или через 48 часов представляет собой положительный результат теста. Отсутствие каких-либо линий осадков регистрируется как отрицательный результат теста. Могут возникнуть неспецифические линии.

8 Испытание на клеточно-опосредованный иммунитет

8.1 Обнаружение системного клеточно-опосредованного ответа предшествует обнаружению продукции антител. Животные, которые минимально инфицированы, часто не реагируют на серологическое тестирование, но могут положительно реагировать на тесты, измеряющие клеточно-опосредованный иммунитет (КОИ). В инфицированных

СТ РК 3504-2019

популяциях ожидается, что гораздо большее число животных будет реагировать в тестах на КОИ по сравнению с тестами на антитела, поскольку КОИ указывает на воздействие, в то время как антитела указывают на прогресс инфекции.

8.2 Анализ высвобождения гамма-интерферона

Анализ основан на высвобождении гамма-интерферона из сенсibilизированных лимфоцитов в течение 18 либо 36-часового инкубационного периода со специфическим антигеном (очищенное белковое производное [PPD] птичьего туберкулина, PPD бычьего туберкулина или джонином). Количественное определение бычьего гамма-интерферона осуществляется с помощью сэндвич-ИФА, в котором используются два моноклональных антитела к бычьему гамма-интерферону. Для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота разработан коммерческий диагностический тест, основанный на выявлении гамма-интерферона. Метод и необходимые испытательные материалы полностью описаны в инструкциях, прилагаемых к коммерческому набору.

8.2 Гиперчувствительность замедленного типа

Кожный тест на гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) является мерой клеточного иммунитета, но имеет ограниченное значение. Тест проводят путем внутрикожной инокуляции 0,1 мл антигена в подстриженный или выбритый участок, обычно со стороны средней трети шеи.

Толщина кожи измеряется с помощью штангенциркуля до и через 72 часа после прививки. Увеличение толщины кожи более 2 мм следует рассматривать как указание на наличие ГЗТ. Следует отметить, что положительные реакции у оленей могут принимать форму диффузных бляшек, а не дискретных ограниченных опухолей, что затрудняет чтение теста. Наличие любого набухания следует рассматривать как положительное у этого вида. Однако сенсibilизация к комплексу *M. avium* широко распространена у животных, и ни птичий туберкулин, ни джонин не являются высокоспецифичными. Кроме того, интерпретация результатов кожных тестов осложняется отсутствием согласия в отношении критериев интерпретации.

УДК 636.2

МКС 65.020.30 (NEQ)

Ключевые слова: паратуберкулез, болезнь Джона, лабораторный метод, протокол испытаний, идентификация агента, серологический тест.

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3504-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





Басуға _____ ж. Қол қойылды. Пішімі 60x84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «Kz Times New Roman»,
«Times New Roman»

Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы _____ дана. Тапсырыс _____

«Қазакстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Нұр-Сұлтан қаласы, Мәңгілік Ел даңғылы, 11 үй
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8(7172) 27-08-14, 44-64-50