УДК 636 : 576.8.07 : 006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ПТИЦА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ

Методы лабораторной диагностики болезни Ньюкасла

Agricultural poultry.
Methods of laboratory diagnostics
of Newcastle disease

ГОСТ 25587—83

(СТ СЭВ 1742—79)

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 12 января 1983 г. № 97 срок действия установлен

с 01.07.83
до 01.07.88

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на кур, индеек, фазанов, цесарок и устанавливает методы лабораторной диагностики болезни Ньюкасла.

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

Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 1742—79.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Для выделения вируса от больной или павшей в первые 10—12 ч птицы берут головной мозг, трахею, легкие, селезенку, печень, почки.

Пробы патологического материала берут с соблюдением правил асептики в стерильную стеклянную посуду с 50%-ным раствором глицерина на дистиллированной воде.

1.2. Для определения антител в сыворотке крови берут стерильно в пробирки, увлажненные физиологическим раствором, пробы крови из подкрыльцовой вены птиц. Полученную кровь выдерживают до образования сгустка при комнатной температуре или в термостате при 37°С в течение 1—2 ч, затем осторожно обводят иглой или пастеровской пипеткой и оставляют на 16 ч в рефрижераторе при температуре 2—4°С.

Образовавшуюся прозрачную без гемолиза сыворотку отсасывают пипеткой в стерильные пробирки.

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

gost.e-ecolog.ru

С целью ретроспективной диагностики пробы крови берут через 12—14 сут после первых признаков клинического проявления болезни.

1.3. Сыворотку исследуют в течение 3 сут с момента взятия. В случае длительного хранения в сыворотку добавляют мертиолат натрия в концентрации 1 : 10000.

1.4. Пробы патологического материала и сывороток крови доставляют в лабораторию в термосе со льдом с сопроводительным документом, содержащим данные о клинике, эпизоотологии заболевания и вскрытии трупов.

1.5. До начала лабораторного исследования патологический материал и сыворотки крови хранят в рефрижераторе при температуре 2—4°С.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Метод выделения вируса

Сущность метода заключается в выявлении патогенного действия вируса на эмбрионы кур, его гемагглютинирующих свойств с последующей идентификацией серологическим методом, определении титра и вирулентности выделенного вируса.

2.1.1. *Аппаратура, реактивы и материалы*

Для проведения исследования применяют:

термостат с температурой нагрева 37—38°С;

центрифугу лабораторную с частотой вращения 3000 об/мин;

стаканы центрифужные вместимостью 50 и 100 $см^3$;

весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,01 г;

размельчитель тканей;

овоскоп;

колбы конические стеклянные вместимостью 100 $см^3$ по ГОСТ 1770—74;

пробирки стеклянные вместимостью 10, 15 и 20 $см^3$ по ГОСТ 25336—82;

пипетки пастеровские или пипетки стеклянные измерительные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 20292—74;

ступку фарфоровую;

шприцы с иглами;

стекло кварцевое;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—77, 0,87%-ный раствор (физиологический) с pH 7,2—7,4;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77, 3%-ный раствор или другие дезинфицирующие растворы;

натрий лимоннокислый по ГОСТ 22280—76, трехзамещенный, 5%-ный раствор;

йод по ГОСТ 4159—79, 5%-ный раствор;

антибиотики (пенициллин, стрептомицин, неовитин);
парафин по ГОСТ 23683—79;
развивающиеся эмбрионы кур 9—10-суточного возраста;
эритроциты кур в физиологическом растворе, 1%-ная взвесь; готовят следующим образом: кровь берут у петухов или кур в возрасте старше 6 мес из покрыльцовой вены в колбу с физиологическим раствором лимоннокислого натрия. Полученную кровь отмывают физиологическим раствором, осаждая центрифугированием с частотой вращения 1500 об/мин в течение 10 мин. Из осадка отмытых эритроцитов готовят 1%-ную суспензию на физиологическом растворе и хранят не более 5 сут при температуре 4°С.

2.1.2. *Подготовка к исследованию*

Пробы патологического материала стерильно извлекают из глицеринового раствора, трехкратно ополаскивают стерильным физиологическим раствором и гомогенизируют в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1 : 5 с помощью размельчителя тканей или размельчают в ступке с кварцевым стеклом, центрифугируют с частотой вращения 1500—2000 об/мин в течение 20 мин.

Надосадочную жидкость отсасывают пипеткой и обрабатывают в течение 30 мин при комнатной температуре антибиотиками: 1000—2000 ЕД/см^3 пенициллина и 500—1000 ЕД/см^3 стрептомицина для подавления посторонней микрофлоры.

2.1.3. *Проведение исследования*

Надосадочную жидкость исследуют в капельной реакции гемагглютинации с 1%-ной суспензией эритроцитов кур.

Для исследования одной пробы материала заражают не менее 10 эмбрионов 9—10-суточного возраста. Контролем служат 3—5 незараженных эмбрионов.

Перед заражением эмбрионы предварительно овоскопируют, отмечая границу пуги. Сбоку эмбриона между кровеносными сосудами отмечают участок для прокола скорлупы и инокуляции испытуемого материала. Скорлупу со стороны пуги и место прокола дезинфицируют и обрабатывают фламбированием. В центре воздушного пространства и в месте введения материала делают пробойником отверстия, затем через боковое отверстие вводят 0,2 см^3 испытуемого материала на глубину 2—3 мм в аллантоисную полость. После заражения эмбрионов отверстия в скорлупе заливают парафином. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубируют в термостате в течение 120 ч при температуре 37°С.

В процессе инкубации эмбрионы овоскопируют два раза в сутки через 12 ч. Эмбрионы, погибшие в течение первых 24 ч, уничтожают, остальные сохраняют в холодильнике при температуре 4°С.

Через 72 ч инкубации пять эмбрионов охлаждают при температуре 4°С в течение 12—18 ч, остальные пять инкубируют до 120 ч, а затем охлаждают при 4°С в течение 16—18 ч.

Перед вскрытием эмбрионов скорлупу над воздушным пространством дезинфицируют 5%-ным раствором йода или фламбируют, вскрывают и собирают экстраэмбриональную (аллантоисно-амниотическую) жидкость в стерильные пробирки от каждого эмбриона отдельно. Велогенные штаммы вируса убивают куриные эмбрионы через 32—60 ч инкубации, мезогенные — через 60—90 ч, лентогенные — через 100 ч и более.

Взятые из каждого эмбриона образцы экстраэмбриональной жидкости проверяют на гемагглютинирующую активность вируса в капельной реакции гемагглютинации (РГА), которую ставят на стекле путем смешивания капли экстраэмбриональной жидкости с каплей 1%-ной взвеси эритроцитов кур.

При отсутствии РГА экстраэмбриональную жидкость, взятую в количестве 1 см^3 от каждого зараженного эмбриона (не менее 5), соединяют и повторно заражают развивающиеся куриные эмбрионы 9—10-суточного возраста (не менее 10 эмбрионов).

Выделение вируса проводят в течение 3—5 пассажей на куриных эмбрионах, проверяя в каждом пассаже экстраэмбриональную жидкость на наличие гемагглютининов в капельной РГА. Если титры гемагглютининов низкие, проводят еще 2—3 дополнительных пассажа.

2.1.4. *Обработка результатов*

Пробу испытуемого материала считают отрицательной, если во всех проведенных пассажах не будут обнаружены гемагглютинация эритроцитов и патогенное действие вируса (гибель эмбрионов).

При наличии гемагглютинации эритроцитов или гибели эмбрионов проводят идентификацию выделенного вируса, определяют титр и вирулентность вируса на эмбрионах кур.

2.2. Метод постановки реакции гемагглютинации

Сущность метода заключается в способности вируса болезни Ньюкасла агглютинировать эритроциты кур.

2.2.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.1.1 и дополнительно:

микротитратор Такачи;

доски из плексигласа.

2.2.2. *Проведение исследования*

Готовят двукратные разведения вируссодержащего материала от 1 : 2 до 1 : 1024. Для этого в ряд лунок планшетки из плексигласа (или пробирок) наливают физиологический раствор в

объеме 0,2 см³. Затем в первую лунку вносят 0,2 см³ вируса, трехкратно пипетируют и переносят 0,2 см³ смеси во вторую лунку и т. д. до требуемого разведения. Из последней лунки 0,2 см³ смеси удаляют в дезинфицирующий раствор (1%-ный раствор гидроокиси натрия).

В каждую лунку добавляют по 0,2 см³ 1%-ной суспензии куриных эритроцитов. Планшеты с лунками встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

Контролем реакции служат две лунки (пробирки) с эритроцитами и физиологическим раствором в равных объемах, по 0,2 см³ каждого. РГА также можно ставить микротитратором Такачи в объеме 0,025 см³ в планшетах с лунками.

2.2.3. *Обработка результатов*

Образование на дне и стенках лунок (пробирок) осадка эритроцитов в виде опрокинутого «зонтика» свидетельствует о положительной РГА.

При отрицательной реакции в опыте и контроле эритроциты образуют на дне лунок (пробирок) диск с ровными краями.

Титром вируса считается предельное разведение его, при котором наблюдается полная агглютинация эритроцитов, что соответствует 1 агглютинирующей единице (1АЕ).

2.3. Метод идентификации вируса

Сущность метода заключается в способности специфических антител нейтрализовать гемагглютинирующую способность вируса в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с эталонными специфическими сыворотками к вирусу болезни Ньюкасла и типировании антител в сыворотке крови больных, переболевших или подозреваемых в заболевании птиц с эталонными диагностическими антигенами вируса болезни Ньюкасла. Для дифференциации в реакцию вводят сыворотку против вируса гриппа птиц.

2.3.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.2.1, и дополнительно:

аппарат Киппа;

баню водяную;

кислоту соляную по ГОСТ 3118—77, 30%-ный раствор;

мел;

набор диагностический специальный, который содержит по одной ампуле (флакону) сухого эталонного антигена вируса болезни Ньюкасла и гриппа птиц (по 1 см³ антигена в каждой фасовке) и по одной ампуле (флакону) специфической иммунной сыворотки к вирусу болезни Ньюкасла и вирусу гриппа птиц (по 1 см³ сыворотки в каждой фасовке);

сыворотки иммунные; готовят следующим образом: содержимое ампулы (флакона) со специфической сывороткой разводят

1 см³ физиологического раствора. Антиген готовят следующим образом: ампулы (флаконы) с антигенами разводят физиологическим раствором (pH 7,2—7,4) до первоначального объема высушенного вируса, т. е. добавляют 1 см³ физиологического раствора.

2.3.2. *Подготовка к исследованию*

Для получения рабочей дозы вируса (4АЕ) образец экстраэмбриональной жидкости или антигена разводят физиологическим раствором во столько раз, сколько получают от деления на 4 цифры, указывающей гемагглютинирующий титр вируса.

Например, если титр гемагглютинации 1 : 256, то рабочее разведение будет 256 : 4 = 64. Для его приготовления необходимо взять 63 см³ физиологического раствора и 1 см³ исходного вируса. Разведенный 1 : 64 вирус будет содержать 4АЕ.

Перед постановкой основного опыта проверяют правильность выбора 4АЕ. Для этого берут пять лунок; в первую и вторую наливают по 0,2 см³ вируссодержащего 4 АЕ, после чего во вторую третью, четвертую и пятую лунки наливают по 0,2 см³ физиологического раствора. После пипетирования из второй лунки переносят 0,2 см³ смеси в третью и т. д., из пятой лунки удаляют 0,2 см³ в дезинфицирующий раствор. Таким образом, во второй лунке остается 2АЕ, в третьей — 1АЕ, в четвертой — 0,5АЕ, а в пятой — 0,25АЕ. После этого в каждую лунку добавляют по 0,2 см³ 1%-ной суспензии эритроцитов, доски встряхивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

При правильном выборе рабочей дозы (4АЕ) в первой, второй и третьей лунках должна быть полная агглютинация, а в четвертой и пятой лунках агглютинации не должно быть.

Если в четвертой лунке оказывается частичная или полная агглютинация, то это означает, что выбранная доза вируса содержит не 4АЕ, а больше. В этом случае доза должна быть уменьшена. Особенно важно, чтобы в третьей лунке, где должна быть 1АЕ вируса, была полная агглютинация. Если в ней агглютинация не полная, то выбранная рабочая доза содержит меньше 4АЕ и должна быть увеличена.

Для приведения рабочей дозы к 4АЕ добавляют соответственно физиологический раствор или вирус и повторно проверяют величину рабочей дозы вируса.

2.3.3. *Проведение исследования*

Для постановки основного опыта в ряд лунок, начиная со второй, наливают по 0,2 см³ физиологического раствора. Затем в первую и вторую лунки добавляют по 0,2 см³ приготовленной специфической сыворотки. Во второй лунке пипетируют и переносят 0,2 см³ смеси в третью лунку и т. д. до требуемого разведения. После этого во все лунки вносят по 0,2 см³ рабочего разведения вируса (4АЕ). Доски встряхивают и после 30 мин контакта

сыворотки с вирусом в каждую лунку добавляют по 0,4 см³ 1%-ной суспензии эритроцитов.

Для точности учета РТГА ставят контроль:

сыворотки — для исключения присутствия гемагглютининов к куриным эритроцитам (0,2 см³ сыворотки, 0,2 см³ физиологического раствора и 0,2 см³ 1%-ной суспензии эритроцитов);

стандартных диагностикумов (0,2 см³ 2АЕ антигена, 0,2 см³ гомологичной ему сыворотки и 0,2 см³ 1%-ной суспензии эритроцитов);

эритроцитов — на спонтанную агглютинацию (0,2 см³ физиологического раствора и 0,2 см³ 1%-ной суспензии эритроцитов).

Учет результатов проводят визуально через 20—30 мин после оседания эритроцитов в контроле.

2.3.4. *Обработка результатов*

РТГА считают положительной, если специфическая сыворотка к вирусу болезни Ньюкасла полностью тормозит гемагглютинирующую активность вируса (испытуемого штамма) не менее $^1/_4$ до $^1/_8$ ее гомологического титра.

2.4. Метод титрования вируса

Сущность метода заключается в определении титра вируса на эмбрионах кур.

2.4.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.1.1, и дополнительно:

развивающиеся эмбрионы кур 9—10-суточного возраста от птицы, вакцинированной вакциной из группы лентогенных штаммов не менее чем за 3 мес до сбора инкубационного яйца.

2.4.2. *Подготовка к исследованию*

Готовят 10-кратные разведения испытуемого вируса следующим образом:

в 10 стерильных пробирок наливают по 9 см³ стерильного физиологического раствора. Затем в первую пробирку вносят 1 см³ испытуемого вируса, не касаясь ее содержимого, получают разведение 10^{-1}. Затем новой пипеткой после 3-кратного перемешивания содержимого в первой пробирке отбирают 1 см³ и переносят во вторую пробирку, не касаясь ее содержимого. Так готовят и последующие разведения до 10^{-1} включительно, используя при этом на каждое разведение отдельную градуированную пипетку.

2.4.3. *Проведение исследования*

Приготовленными 10-кратными разведениями вируса инокулируют по пять куриных эмбрионов по п. 2.1.3 в дозе 0,1 см³ и инкубируют в течение 144 ч. Овоскопию проводят каждые 12 ч, при этом эмбрионы, погибшие в первые 24 ч, не учитываются.

Через 144 ч инкубации все эмбрионы охлаждают при 4°С в течение 16—18 ч и с экстраэмбриональной жидкостью зараженных эмбрионов ставят РГА.

Из погибших и выживших эмбрионов принимают в расчет только те, которые дали положительную РГА.

2.4.4. *Обработка результатов*

Вычисление $ЛД_{50}$ для куриных эмбрионов проводят по методу Рида и Менча.

2.5. Метод определения вирулентности вируса

Сущность метода заключается в определении вирулентности вируса для куриных эмбрионов.

2.5.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.4.1.

2.5.2. *Подготовка к исследованию*

Подготовка к исследованию — по п. 2.4.2.

2.5.3. *Проведение исследования*

Типизация вируса проводится определением среднего времени гибели 9—10-суточных куриных эмбрионов, вызванной минимальной летальной дозой.

Для проведения исследования используют разведения 10^{-1}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} и 10^{-10}.

Каждым из этих разведений инокулируют по пять эмбрионов 9—10-суточного возраста в аллантоисную полость в двух повторностях с разрывом в заражении 12 ч, т. е. заражают в 8 ч утра по пять эмбрионов каждый указанным разведением и в 20 ч этими же разведениями вновь по пять эмбрионов. Зараженные эмбрионы овоскопируют ежедневно через 8 ч: в 8 ч утра и 16 ч, регистрируя время гибели каждого эмбриона в течение 12 ч.

2.5.4. *Обработка результатов*

Минимальной летальной дозой (МЛД) считают самое большое разведение, вызывающее гибель всех инокулированных эмбрионов. Среднее время гибели (СВГ) вычисляют делением суммы часов гибели всех эмбрионов, вызванных минимальной летальной дозой, на число эмбрионов. У велогенных штаммов СВГ составляет до 60 ч, у мезогенных штаммов — от 60 до 90 ч, у лентогенных штаммов — более 100 ч.

2.6. Метод определения специфических антител

Сущность метода заключается в обнаружении специфической способности антител сыворотки крови больных и переболевших птиц подавлять гемагглютинирующее действие вируса в реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

2.6.1. *Аппаратура, материалы и реактивы*

Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и реактивы, указанные в п. 2.3.1, и дополнительно:

глицерин по ГОСТ 6259—75;

лед сухой;

калий йоднокислый.

2.6.2. *Подготовка к исследованию*

Исследуемые сыворотки для удаления термолабильных ингибиторов прогревают в водяной бане при 60°С в течение 30 мин.

Для удаления термолабильных ингибиторов через разведенную и прогретую сыворотку пропускают углекислый газ из аппарата Киппа или добавляют кусочки сухого льда. Обработку сыворотки ведут в течение 2—3 мин. Образовавшийся осадок удаляют центрифугированием с частотой вращения 1500 об/мин в течение 10 мин.

Допускается обрабатывать сыворотки раствором йоднокислого калия. Для обработки сыворотки 0,2 см³ сыворотки смешивают с 0,6 см³ раствора А (0,256 г KIO_4 в 100 см³ бидистиллированной воды) и инкубируют в водяной бане в течение 15 мин при 18—20°С. После этого добавляют 0,6 см³ раствора Б (1 см³ глицерина в 100 см³ физиологического раствора), а также 0,2 см³ физиологического раствора. Полученную смесь несколько раз встряхивают и используют в качестве основного разведения сыворотки 1 : 8 для исследования.

2.6.3. *Проведение исследования*

Готовят двукратные разведения сыворотки на физиологическом растворе от 1 : 2 до 1 : 1024. РТГА проводят по п. 2.3.3.

Для постановки реакции допускается использовать микротитратор Такачи. При этом она проводится аналогичным образом в панелях с лунками в объемах 0,025 и 0,050 см³.

Учет реакции проводят через 30 мин после оседания эритроцитов в контроле.

2.6.4. *Обработка результатов*

Титром сыворотки считают последнее ее разведение, которое дает полную задержку гемагглютинации с заведомо известным антигеном.

Выявление титров 1 : 4 и выше у отдельных экземпляров птицы дает основание для проведения вирусологических исследований, т. е. выделения и идентификации вируса.

Выделенный и типизированный со специфическими сыворотками вирус служит основанием для постановки диагноза.

Изменение № 1 ГОСТ 25587—83 Птица сельскохозяйственная. Методы лабораторной диагностики болезни Ньюкасла

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.03.88 № 597

Дата введения 01.07.88

Под наименованием стандарта проставить код: ОКСТУ 9809.

По всему тексту стандарта заменить единицу: об/мин на мин$^{-1}$.

Вводная часть. Первый абзац после слова «цесарок» дополнить словами: «перепелок, павлинов, голубей».

Пункт 1.1. Первый абзац. Исключить слова: «в первые 10—12 ч», «печень, почки»;

второй абзац после слов «стеклянную посуду» дополнить словами: «без консервирования или».

Пункт 2.1.1. Шестнадцатый абзац дополнить словами: «на физиологическом растворе»;

последний абзац после слов «Полученную кровь» дополнить словами: «трижды», после слова «осаждая» дополнить словом: «эритроциты».

Пункт 2.1.2. Второй абзац. Заменить слово: «посторонней» на «бактериальной»;

дополнить словами: «Проводят контроль надосадочной жидкости на стерильность с использованием питательных сред мясопептонного бульона (МПБ), мясопептонного агара (МПА), мясопептонного печеночного бульона под вазелиновым маслом (МППБ) и среды Сабуро».

Пункт 2.1.3. Второй абзац изложить в новой редакции: «Для исследования одной пробы материала берут 15 эмбрионов 9—10-суточного возраста, 10 эмбрионов заражают, а 5 служат контролем»;

четвертый абзац. Заменить слова: «два раза в сутки через 12 ч» на «ежедневно утром и вечером»;

шестой абзац после слов «от каждого эмбриона отдельно» изложить в новой редакции: «Велогенные и мезогенные штаммы вируса вызывают гибель эмбрионов кур через 30—60 ч инкубации, лентогенные — через 100 ч и более».

Пункт 2.3.2. Третий абзац дополнить словами: «Контролем реакции служат две лунки (пробирки) с эритроцитами и физиологическим раствором в равных объемах по 0,2 см^3 каждого».

Пункт 2.4.2. Второй абзац после слов «последующие разведения до» заменить значение: 10^{-1} на 10^{-10}.

Пункт 2.4.3. Первый абзац. Заменить слово: «пять» на «четыре»;

заменить значение: 144 на 120 (2 раза).

Пункт 2.6.2. Первый абзац. Заменить значение: 60 °С на 56 °С.

Пункты 2.6.2, 2.6.3, 2.6.4. Второй абзац исключить.

Пункт 2.6.4. Третий абзац после слова «диагноза» дополнить словами: «с учетом клинических, патологоанатомических и эпизоотологических данных».

Раздел 2 дополнить пунктом — 2.7: «2.7. Постановка биопробы

(Продолжение см. с. 352)

Постановку биопробы проводят только в сомнительных случаях (отсутствие клинических признаков и патологоанатомических изменений у птиц при выделении вируса из гомогенатов исследуемых органов).

Биопробу проводят на неимунной к болезни Ньюкасла птице того же возраста (старше 90 сут) и породы, на которой установлено заболевание.

Перед постановкой биопробы птиц проверяют на отсутствие в крови антигемагглютининов.

Четырем птицам (у которых не обнаружено в крови антигемагглютининов) внутримышечно вводят 1,0 $см^3$ 10 %-ной суспензии исследуемых органов или аллантоисной вируссодержащей жидкости. За зараженной птицей устанавливают наблюдение в течение 10 сут.

При наличии в исследуемом материале вирулентного вируса болезни Ньюкасла птица заболевает через 3—5 сут после заражения и погибает через 2—5 сут после начала заболевания.

При отрицательном результате биопробы зараженные птицы должны остаться живыми. При гибели хотя бы одной из четырех зараженных птиц биопроба считается положительной».

(ИУС № 6 1988 г.)

gost.e-ecolog.ru