ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 72371— 2025

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2025

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») совместно с Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 11 ноября 2025 г. № 1352-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2025

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Условия выполнения исследований и требования безопасности 3
5 Отбор образцов 4
6 Алгоритм диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота и диагностическое значение методов 7
7 Реакция нейтрализации микрометодом в перевиваемой культуре клеток для обнаружения антител к вирусу вирусной диареи крупного рогатого скота 8
8 Иммуноферментный анализ 16
9 Выделение вируса вирусной диареи крупного рогатого скота в первичной культуре клеток 19
10 Выявление РНК вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции 23
11 Реакция иммунофлуоресценции для обнаружения вирусных антигенов 25
Приложение А (обязательное) Классификация питательных сред в соответствии со способом их применения (по составу) в данном документе 26
Приложение Б (справочное) Первичный протокол при постановке реакции нейтрализации исследуемой сыворотки крови 29
Приложение В (справочное) Первичный протокол при постановке реакции нейтрализации без титрования исследуемой сыворотки крови 30
Приложение Г (справочное) Подготовка образцов к исследованию методом ПЦР 31
Приложение Д (справочное) Инструкция по применению комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» 32
Приложение Е (справочное) Инструкция по применению тест-системы «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» 33
Приложение Ж (справочное) Обратная транскрипция и амплификация с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов с помощью приборов Rotor-Gene 3000/6000 и Rotor-Gene Q 34
Приложение И (справочное) Обратная транскрипция и амплификация с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов с помощью приборов iCycler iq5 и iCycler iq 36
Приложение К (справочное) Обратная транскрипция и амплификация с детекцией в режиме «реального времени» и анализ результатов при помощи прибора CFX96 38
Приложение Л (справочное) Интерпретация результатов с применением тест-системы «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» 40
Библиография 41

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Methods for laboratory diagnosis of viral diarrhea in cattle

Дата введения — 2025—11—30

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на методы лабораторной диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота и устанавливает следующие методы диагностики:

- реакция нейтрализации;
- иммуноферментный анализ;
- вирусовыделение в культуре клеток;
- полимеразная цепная реакция;
- реакция иммунофлуоресценции.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.011 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 2768 Ацетон технический. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 10444.1 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 32222 Средства воспроизводства. Сперма. Методы отбора проб

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим показателям

Издание официальное

ГОСТ ISO 7886-1 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **вирусная диарея:** Контагиозное инфекционное заболевание крупного рогатого скота, вызываемое вирусом, относящимся к семейству *Flaviviridae,* роду *Pestivirus* и характеризующееся поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, репродуктивной и иммунной систем.

Примечание — Различают два биотипа возбудителя: цитопатогенный и нецитопатогенный.

3.1.2 **геном вируса вирусной диареи:** Геном вируса представлен одноцепочечной, линейной, положительно-полярной нитью РНК.

3.1.3 **метод иммуноферментного анализа:** Лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску.

3.1.4 **метод полимеразной цепной реакции:** Ферментативная реакция, позволяющая амплифицировать дезоксирибонуклеиновую кислоту *in vitro*.

3.1.5 **обратная транскрипция:** Синтез ДНК с матрицы РНК с использованием фермента обратной транскриптазы в сочетании ОТ-праймером в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.

3.1.6 **реакция нейтрализации:** Метод выявления вируснейтрализующих антител в сыворотке крови животных, основанный на способности антител нейтрализовать инфекционные свойства вируса и возможность его репродукции в чувствительной живой системе.

3.1.7 **метод выделения вируса вирусной диареи в культуре клеток:** Метод выделения вируса вирусной диареи, основанный на размножении вируса в чувствительной культуре клеток.

3.1.8 **питательная среда:** Многокомпонентные жидкости или гели, разработанные для поддержания роста/пролиферации клеток различного происхождения, в состав которых входят различные аминокислоты, соли, витамины, гормоны, факторы прикрепления и роста, смешанные в определенных пропорциях.

3.1.9 **первичная культура клеток:** Культура клеток, полученная из ткани и выращенная *in vitro* до начала субкультивирования, то есть до первого посева.

3.1.10 **субкультура:** Культура клеток, полученная путем пересева (пассажа) клеток первичной культуры.

3.1.11 **перевиваемая культура клеток:** Культура клеток, способная к размножению вне организма неопределенно продолжительное время.

3.1.12 **реакция иммунофлуоресценции:** Иммунологический метод для качественного и количественного определения поверхностных и внутриклеточных антигенов, обработанных флуоресцирующими иммуноглобулинами.

3.1.13 **титр вируса:** Наивысшее разведение (доза) вируса, поражающее 50 % тест-объектов.
3.1.14 **ФИТЦ-иммуноглобулин:** Антитела меченные флуоресцеин изотиоцианатом.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

БР — буфер для разведения образцов и конъюгата;
ВД — вирусная диарея;
ВКО — экзогенный внутренний контрольный образец;
ГРМ — гидролизат рыбной муки;
ДМСО — диметилсульфоксид;
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;
ИД — инфекционная доза;
ИФА — иммуноферментный анализ;
кДНК — комплементарная ДНК;
КК — культура клеток;
КЛ — клетка;
КРД — контроль рабочей дозы вируса;
КРС — крупный рогатый скот;
НК — нуклеиновая кислота;
ОК — отрицательный контроль экстракции;
ОКО — отрицательный контрольный образец;
ОП — оптическая плотность;
ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
ПБА — патогенные биологические объекты;
ПК — положительный контроль экстракции;
ПКО — положительный контрольный образец;
ПТ-80 — перевиваемая культура клеток почки теленка;
РИФ — реакция иммунофлуоресценции;
РН — реакция нейтрализации;
РНК — рибонуклеиновая кислота;
ТБ — первичная культура клеток тестикул бычка;
ТМБ — тетраметилбензидин;
ТЦД — тканевая цитопатическая доза;
ФИТЦ — флуоресцеин изотиоцианат;
ФСБ — фосфатно-солевой буфер;
ФСБТ — фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
ЦПД — цитопатическое действие;
NS — отрицательная (нормальная) сыворотка;
SS^+ — положительная (специфическая) сыворотка.

4 Условия выполнения исследований и требования безопасности

4.1 Условия выполнения исследований

4.1.1 Общие требования к помещениям — по ГОСТ ISO 7218.
4.1.2 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ISO/IEC 17025.
4.1.3 К проведению исследований допускаются квалифицированные сотрудники, имеющие опыт работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности, изучившие методики микробиологических работ.

4.2 Требования безопасности

4.2.1 Требования безопасности при работе с микроорганизмами — по [1], [2].
4.2.1 Общие требования безопасности при проведении работ — согласно ГОСТ 12.1.008.
4.2.2 Средства защиты работающих должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.4.011.
4.2.3 Воздух рабочей зоны должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005.

4.2.4 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности, установленным в ГОСТ 12.1.004.

4.2.5 При работе с электроустановками необходимо соблюдать требования электробезопасности, установленные в ГОСТ 12.1.019.

4.2.6 Диагностические исследования на вирусную диарею крупного рогатого скота проводят в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с ПБА III—IV группы патогенности.

4.2.7 Обеззараживание материала после исследований, а также использованных индивидуальных средств защиты, инструментов и так далее проводят путем кипячения в течение 30 мин или автоклавирования в течение 60 мин при давлении 0,2 МПа и температуре (132 ± 2) °С или химическим способом с применением дезинфицирующих средств согласно инструкции по их применению. При обеззараживании необходимо соблюдать санитарные правила [2].

5 Отбор образцов

5.1 Общие требования

5.1.1 Отбор образцов должно производить лицо, имеющее специальную подготовку и документ, подтверждающий соответствующие полномочия, и несущее ответственность за правильность отбора.

5.1.2 Материал для диагностики вирусной диареи КРС отбирают от каждого животного отдельно с соблюдением правил асептики и антисептики (при перемещении/продаже животных, от больных и подозреваемых в заболевании, быков-производителей).

5.1.3 При исследовании в благополучных хозяйствах, животных с неизвестным статусом, при оздоровлении и проведении профилактических мер образцы отбирают согласно плану противоэпизоотических мероприятий.

5.1.4 От больного животного отбирают образцы биологического материала в период максимального проявления клинических признаков (повышение температуры тела, угнетение, воспалительные процессы в верхних дыхательных путях, диарея, истечения из носовой, ротовой полости и глаз, аборты у коров).

5.1.5 При исследовании спермы образцы отбирают от каждой партии.

5.1.6 Культуру клеток исследуют на контаминацию вирусом вирусной диареи крупного рогатого скота при входном контроле и по требованиям технологического цикла.

5.1.7 Вместе с образцами направляют сопроводительное письмо, которое должно содержать следующие основные данные:

- дату и время отбора образцов, место отбора, вид образцов, количество;
- сведения о владельце животного;
- сведения о животном (вид животного, идентификационный номер, пол, возраст, сведения о вакцинации).

Образцы должны быть промаркированы согласно сопроводительному письму (указан порядковый номер, инвентарный номер или кличка животного).

5.1.8 Транспортирование образцов осуществляют во влагонепроницаемой таре, герметично упакованной. Образцы биологического, патологического материала охлаждают и на период транспортировки помещают в термос со льдом или иным охладителем. Образцы замороженной спермы перевозят в сосудах Дьюара с жидким азотом. Упаковка и транспортирование образцов биологического, патологического материала должны обеспечивать их сохранность и пригодность для исследований в течение срока транспортировки.

5.2 Способы отбора материала для исследования

5.2.1 От вынужденно убитых и павших животных образцы патологического материала отбирают не позднее 2 ч после убоя или падежа. Для исследования отбирают кусочки лимфоидных органов (селезенки, миндалин, участков пейеровых бляшек, брыжеечных лимфатических узлов и тимуса), также кусочки носовой перегородки, трахеи, гортани, легких, почек, кусочки плаценты, абортированные плоды. Кусочки органов массой от 20 до 30 г помещают в стерильную посуду.

5.2.2 Для получения сыворотки цельную кровь отбирают в стерильные одноразовые пробирки с активатором свертывания. Сыворотка крови должна быть прозрачная, соломенно-желтого цвета. Допускается легкая степень гемолиза (розовый цвет).

Для ретроспективной диагностики используют парные образцы сывороток крови, полученные от больных или подозреваемых в заражении животных, в начале заболевания и через 14—21 сут. Образцы сывороток первого и второго отбора исследуют одновременно.

5.2.3 Для исследования цельной крови или плазмы взятие крови проводят в стерильные пробирки с антикоагулянтом (кроме гепарина).

5.2.4 Сперму от быков-производителей для исследования берут согласно ГОСТ 32222. Далее образцы отбирают в стерильные пробирки без наполнителя, в объеме не менее 0,5 $см^3$. Если сперма расфасована в пайеты, то на исследование направляют от одного животного не менее 3 доз (пайет).

5.2.5 Смывы берут стерильными тампонами во флаконы с добавлением 0,5—5 $см^3$ стерильного физиологического раствора или коммерческой транспортной среды (согласно инструкции производителя) путем интенсивного обтирания поверхности слизистых оболочек.

5.2.6 Фекалии отбирают в объеме 1—5 г в стерильные пластиковые контейнеры.

5.2.7 Перед отбором образцов молока первые порции сдаивают, затем в объеме 10—20 $см^3$ собирают в стерильные пластиковые контейнеры.

5.2.8 Соскобы с пораженных участков слизистых оболочек ротовой полости отбирают с помощью медицинского инструмента (скальпель, шпатель и др.) не менее чем с 2—3 поражений. Собранный материал помещают в стерильную емкость с добавлением 2—4 $см^3$ физиологического раствора или коммерческой транспортной среды (согласно инструкции производителя).

5.2.9 Мазки со слизистых оболочек (не менее трех препаратов) готовят на тщательно обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Забор материала проводят после удаления слизи стерильным сухим мягким ватным тампоном, без грубого давления на поверхность слизистых оболочек во избежание утраты эпителия. Рекомендуемая методика забора материала: цитощетку, расположенную на поверхности слизистой оболочки, поворачивают пять раз по часовой стрелке на 360°. Закономерно появление «кровавой росы», что свидетельствует о получении информативного образца, где, кроме слизи, присутствуют клетки практически всех слоев эпителиального пласта.

Качественный мазок должен быть максимально тонким и не должен содержать «толстые участки», включающие «не просматриваемые» скопления или комплексы клеток. Материал должен распределяться равномерно вдоль стекла (не поперек или кругами) (см. рисунок 1).

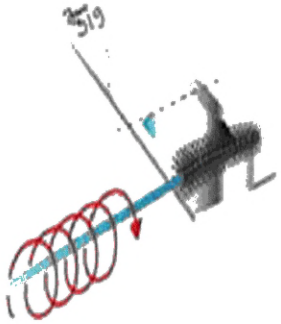

Рисунок 1 — Способ нанесения материала на предметное стекло

5.2.10 Мазки-отпечатки срезов внутренних органов (не менее трех препаратов) для исследования методом РИФ готовят на обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Параллельно отбирают кусочки органов по 5.2.1 и отправляют в лабораторию вместе с мазками-отпечатками для исследования другими методами при сомнительном результате РИФ или непригодных для исследования мазках.

Примечание — Допускается отобрать от вынужденно убитых и павших животных только патологический материал в стерильную посуду и доставить в лабораторию для исследования.

5.2.11 Для контроля культур клеток используют метод РИФ или ОТ-ПЦР. В зависимости от вида КК исследуют монослой или клеточную суспензию.

Культивирование культуры клеток проводят согласно паспорту.

Для контроля культур клеток методом РИФ монослой клеточных линий выращивают на стерильных предметных/покровных стеклах или исследуют клеточную суспензию не менее 100 000 клеток (не менее трех препаратов).

Для контроля культур клеток методом ОТ-ПЦР исследуют клеточную суспензию не менее 900 000 клеток.

Примечание — При невозможности отбора образцов в количестве, указанном в 5.2, образцы необходимо отбирать в максимально возможном количестве.

5.3 Условия транспортировки и хранения образцов для исследования

Таблица 1 — Сроки доставки, режимы транспортировки и хранения образцов для исследования

Исследуемый материал	Метод исследования	Транспортировка		Хранение	
		Температурный режим	Сроки	Температурный режим	Сроки
Сыворотка крови	РН ИФА ОТ-ПЦР	со сгустком от 2 °С до 8 °С	1—3 сут	со сгустком от 2 °С до 8 °С	1—6 сут
		без сгустка от 2 °С до 8 °С	1—3 сут	без сгустка от 2 °С до 8 °С	1—10 сут
		без сгустка от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут	без сгустка от минус 16 °С до минус 24 °С	до 3 мес
				без сгустка минус 68 °С и ниже	длительно
Цельная кровь	ОТ-ПЦР Вирусовыделение	от 2 °С до 8 °С	1 сут	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут
Плазма	ИФА ОТ-ПЦР	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут	от 2 °С до 8 °С	1—6 сут
		от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут	от минус 16 °С до минус 24 °С	до 3 мес
				минус 68 °С и ниже	длительно
Молоко	ИФА ОТ-ПЦР	от 2 °С до 8 °С	1 сут	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут
				от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут
				минус 68 °С и ниже	длительно
Тканевой материал	ОТ-ПЦР Вирусовыделение	от 2 °С до 8 °С	1 сут	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут
		от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут	от минус 16 °С до минус 24 °С	до 3 мес
				минус 68 °С и ниже	длительно
	РИФ	от 2 °С до 8 °С	до 6 ч	не допускается	
Фекалии	ОТ-ПЦР Вирусовыделение	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут
		от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут	от минус 16 °С до минус 24 °С	до 3 мес
				минус 68 °С и ниже	длительно

Окончание таблицы 1

Исследуемый материал	Метод исследования	Транспортировка		Хранение	
		Температурный режим	Сроки	Температурный режим	Сроки
Сперма	Вирусовыделение РИФ	доставка в сосудах Дьюара с жидким азотом	1—7 сут	минус 68 °С и ниже	длительно
	ОТ-ПЦР	от минус 16 °С и ниже	1—7 сут	от минус 16 °С и ниже	длительно
Смывы	ОТ-ПЦР Вирусовыделение	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут
		от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут	от минус 16 °С до минус 24 °С	до 3 мес
				минус 68 °С и ниже	длительно
Соскобы	ОТ-ПЦР Вирусовыделение	от 2 °С до 8 °С	до 12 ч	от 2 °С до 8 °С	1—3 сут
		от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут	от минус 16 °С до минус 24 °С	до 3 мес
				минус 68 °С и ниже	длительно
Мазки-отпечатки/мазки со слизистых оболочек	РИФ	от 2 °С до 8 °С	до 6 ч	фиксированные ледяным ацетоном мазки минус (20 ± 1) °С	1—7 сут
Культуры клеток	ОТ-ПЦР	от 2 °С до 8 °С	1—7 сут	от 2 °С до 8 °С	до месяца
		от минус 16 °С до минус 24 °С	1—7 сут	от минус 16 °С до минус 24 °С	3 мес
				минус 68 °С и ниже	длительно
	РИФ	согласно паспорту культуры клеток	1 сут	согласно паспорту культуры клеток	согласно паспорту культуры клеток
Примечание — Допускается однократное замораживание биоматериала, кроме сыворотки крови со сгустком, цельной крови, тканевого материала и мазков-отпечатков/мазков со слизистых оболочек для РИФ.					

6 Алгоритм диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота и диагностическое значение методов

Таблица 2 — Алгоритм диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота

Цель	Метод исследования				
	Выделение вируса/обнаружение генома			Обнаружение антител	
	КК	ОТ-ПЦР	РИФ	ИФА	РН
Прижизненная диагностика заболевания					
Мониторинг в благополучном хозяйстве*	+	+++	+	+++	++
Племпродажа/перемещение животного*	+	+++	+	+++	++
Оздоровление*	+++	+++	++	+++	+++
Мониторинг животных с неизвестным статусом*	+++	+++	+	+++	+++

Окончание таблицы 2

Цель	Метод исследования				
	Выделение вируса/обнаружение генома			Обнаружение антител	
	КК	ОТ-ПЦР	РИФ	ИФА	РН
Напряженность иммунитета через 30 дней после вакцинации	–	–	–	++	+++
Ретроспективная диагностика	–	–	–	+++	+++
Посмертная диагностика заболевания					
Постановка диагноза	+++	+++	++	–	–
Контроль культуры клеток/спермы					
Контроль культуры клеток	–	+++	+++	–	–
Сперма	++	+++	++	–	–

* Рекомендуется применение сочетания методов (выделения вируса/обнаружения генома и обнаружения антител).

Примечание — В данной таблице приведены следующие обозначения:

«+++» — рекомендуемый метод;

«++» — подходящий метод;

«+» — может быть использован;

«–» — не подходит для данной цели.

7 Реакция нейтрализации микрометодом в перевиваемой культуре клеток для обнаружения антител к вирусу вирусной диареи крупного рогатого скота

Сущность метода реакции нейтрализации заключается в способности антител нейтрализовать инфекционные свойства вируса и возможность его репродукции в чувствительной культуре клеток. При наличии специфических антител в исследуемой сыворотке образуется комплекс «антиген-антитело», вирус нейтрализуется и монослой культуры клеток остается без изменений — положительный результат. Если в испытуемой сыворотке нет специфических антител, то вирус вызывает ЦПД в чувствительной культуре клеток — результат отрицательный.

7.1 Оборудование, материалы и реактивы

Используют следующие оборудование, материалы и реактивы:

автоматические/механические дозаторы переменного объема;

секундомер/таймер;

камеру Горяева или автоматический счетчик клеток;

весы неавтоматического действия класса точности не ниже II по ГОСТ OIML R 76-1;

CO_2 — инкубатор с температурой нагрева (37 ± 1) °С (с концентрацией CO_2 5 %);

холодильник, обеспечивающий поддержание температуры от 4 °С до 8 °С;

низкотемпературный морозильник, обеспечивающий поддержание температуры минус 70 °С и ниже, либо сосуд Дьюара с жидким азотом;

лабораторную водяную баню с терморегулятором с температурой нагрева до 100 °С;

сухожаровой шкаф с принудительной вентиляцией, обеспечивающий поддержание температуры (56 ± 1) °С;

ламинарный бокс II А класса биобезопасности;

инвертированный микроскоп;

среду «Игла МЕМ с солями Хенкса с двойным набором аминокислот и витаминов»;

сыворотку фетальную крупного рогатого скота (эмбриональную телячью);

раствор Версена 0,02 %-ный;

химопсин 50 мг/фл;
ДМСО или готовую среду для замораживания культуры клеток;
L- аргинин для культуральных работ;
L-глутамин стерильный;
раствор HEPES 1М, pH 7,2—7,4;
контрольную гипериммунную сыворотку, содержащую антитела к вирусу вирусной диареи;
контрольную отрицательную сыворотку, не содержащую антител к вирусу вирусной диареи;
перевиваемая линия культуры клеток почки теленка ПТ-80;
штамм вируса вирусной диареи «Орегон С-24V»;
0,4 %-ный раствор трипанового синего;
стерильные наконечники с фильтром к дозаторам;
культуральные стерильные матрасы;
культуральные стерильные планшеты;
криопробирки;
фильтрующие насадки для шприцев, с диаметром пор 0,22 мкм;
шприцы инъекционные однократного применения стерильные различного объема по ГОСТ ISO 7886-1.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов и наборов, по качеству не ниже вышеуказанных.

Примечание — Для проведения РН допускается применение других методик после верификации в лаборатории.

7.2 Подготовка к исследованию

7.2.1 Подготовка фетальной сыворотки

Перед началом работ фетальную сыворотку инактивируют в объемах не более 50 $см^3$ при (56 ± 1) °С в течение (60 ± 1) мин на водяной бане или в сухожаровом шкафу с принудительной вентиляцией.

7.2.2 Подготовка питательной среды для реакции нейтрализации

Готовят питательную среду для реакции нейтрализации с содержанием 0,06 % L-глутамина, 0,5 % L — аргинина и 1 % раствора HEPES (классификация питательных сред в соответствии со способом их применения приведена в приложении А).

Пример — В 500 $см^3$ питательной среды «Игла МЕМ с солями Хенкса с двойным набором аминокислот и витаминов» растворяют 300 мг L-глутамина. Далее в 100 $см^3$ полученной питательной среды растворяют 0,5 г L-аргинина, пропускают через фильтрующую насадку с диаметром пор 0,22 мкм. Затем добавляют 1 $см^3$ раствора HEPES.

L-аргинин не подлежит хранению в разведенном виде.

7.2.3 Поддержание культуры клеток ПТ-80

Из культурального матраса удаляют ростовую питательную среду и дважды ополаскивают небольшим количеством диспергирующей смеси комнатной температуры (к 450 $см^3$ раствора Версена 0,02 %-ного добавляют 50 мг химопсина) и сливают в дезинфицирующий раствор. После этого в матрасы с клеточным монослоем вносят диспергирующую смесь в количестве 2 $см^3$ для культурального матраса с ростовой поверхностью 25 $см^2$, а для 75 $см^2$ — 4 $см^3$ и помещают в CO_2 — инкубатор при температуре (37 ± 1) °С (с концентрацией CO_2 5 %) до полного отслоения клеток от поверхности матраса. После чего отбирают 0,1 $см^3$ клеточной суспензии для подсчета количества клеток и определения их жизнеспособности по 7.2.4. В соответствии с результатами подсчета общий объем суспензии доводят до требуемой концентрации клеток добавлением питательной среды. При этом учитывают добавление к общему объему среды стерильной фетальной сыворотки крупного рогатого скота в количестве 10 %. Посадочная концентрация перевиваемой культуры клеток ПТ-80 в матрасах должна составлять 100 000—120 000 кл/$см^3$. При просмотре матрасов под инвертируемым микроскопом через 24 ч можно наблюдать образование островков в результате размножения прикрепившихся клеток. Размеры островков постепенно увеличиваются, далее они сливаются, образуя монослой. Выращивание клеток продолжается в течение 3—4 сут, после чего культура клеток может быть использована для постановки РН.

7.2.4 Методика подсчета концентрации клеток и определения их жизнеспособности

Образец клеточной суспензии разводят 1:2 или 1:10 в 0,4 %-ном растворе трипанового синего. Тщательно перемешивают и вносят в камеру Горяева[1)]. Подсчет неокрашенных (живых) и окрашенных (мертвых) клеток проводят по всем квадратам камеры. Концентрацию жизнеспособных клеток в 1 $см^3$ суспензии определяют по формуле

$$X = (A \cdot 1000 \cdot K)/0{,}9,$$

где X — число клеток в 1 $см^3$;

A — число живых клеток в камере;

K — кратность разведения суспензии;

0,9 — объем камеры, $мм^3$;

1000 — количество $мм^3$ в $см^3$.

Процент жизнеспособных клеток рассчитывают по формуле

$$\frac{\text{общее число клеток} - \text{число мертвых клеток}}{\text{общее число клеток}} \cdot 100\ \%.$$

Пример — Общее количество клеток в 1 $см^3$ 462 000, из них число мертвых клеток 23 000. (462 000 – 23 000)/462 000·100 % = 95 %.

Жизнеспособность клеток перевиваемых линий должна составлять в пределах 80—100 %.

7.2.5 Поддержание матричной культуры ПТ-80

При поддержании матричной культуры пересев (пассаж) клеток производят каждые 3—7 сут. Культуры, имеющие дегенеративные изменения, неравномерный или недостаточный рост, подлежат выбраковке. Коэффициент пересева 1:3. Один из матрасов служит для последующего пассажа, другие могут быть использованы для постановки РН.

7.2.6 Хранение культуры клеток

Культуру клеток хранят в условиях термостата при температуре (37 ± 1) °С, при минус 70 °С и ниже — в низкотемпературном морозильнике или жидком азоте при минус (196 ± 1) °С.

Матрасы с качественным монослоем помещают при (37 ± 1) °С, предварительно сменив среду ростовую на поддерживающую. Смену среды производят каждые 6—10 сут. Срок хранения 1—1,5 мес.

При хранении в жидком азоте обеспечивается сохранность жизнеспособности клеток и их чувствительность к вирусам. Культуру клеток выращивают на матрасах до полного формирования монослоя. После снятия с матраса клетки ресуспензируют в небольшом количестве питательной среды, подсчитывают в камере Горяева и доводят концентрацию до 5—$10 \cdot 10^6$ кл/$см^3$ по 7.2.3 питательной средой, в которую в качестве криопротекторов добавляют 10 % ДМСО и фетальную сыворотку в количестве 10 % — 50 % от объема клеточной суспензии. ДМСО не стерилизуют, добавляют к суспензии по каплям, постоянно помешивая вдали от огня. Допускается использовать среду, состоящую из 90 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 10 % ДМСО. В этом случае клеточный монослой суспензируют непосредственно в сыворотке.

Можно использовать готовые коммерческие среды для замораживания культур клеток, согласно инструкции производителя. Взвесь клеток в среде для замораживания разливают в стерильные криопробирки по 1—3 $см^3$, закрывают и выдерживают при температуре (4 ± 1) °С 1—2 ч.

Охлаждение криопробирок от 4 °С до минус 70 °С и ниже проводят в низкотемпературном холодильнике. Замороженные при минус 70 °С и ниже криопробирки с клеточной суспензией помещают для хранения в сосуд Дьюара с жидким азотом или оставляют в низкотемпературном холодильнике при минус 70 °С и ниже.

7.2.7 Поддержание вируса вирусной диареи в культуре клеток ПТ-80

Матрас с монослоем клеток перевиваемой культуры ПТ-80 отмывают питательной средой. Затем заражают вирусом вирусной диареи «Орегон С-24V» с инфекционным титром не менее 4,5—5,0 $ТЦД_{50}$/0,1 $см^3$, в дозе 0,1—0,3 $ТЦД_{50}$/кл. Выдерживают в CO_2 инкубаторе (с концентрацией CO_2 5 %) при температуре (37 ± 1) °С в течение 60—90 мин, а затем добавляют питательную среду для постановки РН с добавлением 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого. Для контроля оставляют

[1)] Подсчет концентрации клеток может осуществляться с использованием автоматических счетчиков клеток согласно инструкции производителя.

один матрас, в котором заменяют ростовую среду на поддерживающую. Зараженную и контрольную культуры клеток инкубируют при температуре (37 ± 1) °С до 7 сут и ежедневно просматривают под инвертируемым микроскопом с целью выявления цитопатического действия вируса, которое проявляется мелкозернистой инфильтрацией, вакуолизацией в перинуклеарной зоне, округлением, уменьшением клеток в размере. Клетки располагаются группами или диффузно, их количество нарастает до полного отслоения от субстрата (см. рисунки 2, 3). При разрушении монослоя на 90 % — 100 % инфицированную вирусом культуру клеток подвергают замораживанию/оттаиванию (при минус 70 °С и ниже и (37 ± 1) °С на водяной бане, соответственно), затем титруют, устанавливают активность, расфасовывают в стерильные криопробирки и замораживают для хранения при минус 70 °С и ниже. Вирус хранят в течение года, затем освежают. Идентификацию хранящегося в музее вируса проводят методом ОТ-ПЦР 1 раз в год.

Примечание — Для длительного хранения вируса возможна его лиофилизация.



Рисунок 2 — Цитопатическое действие вируса вирусной диареи в перевиваемой культуре клеток ПТ-80 через 48 ч после заражения (увеличение 100^{X})

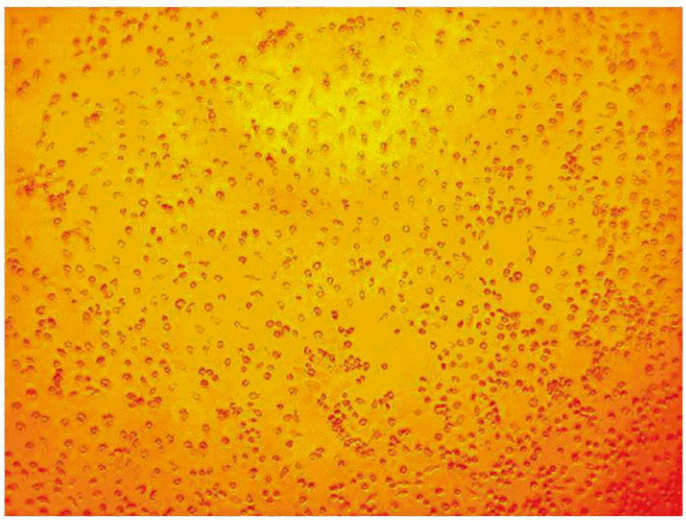

Рисунок 3 — Цитопатическое действие вируса вирусной диареи в перевиваемой культуре клеток ПТ-80 через 72 ч после заражения (увеличение 100^{X})

7.2.8 Титрование исходного вируса и определение $1ИД_{50}/0{,}1см^3$, дающей 50 %-ный эффект ЦПД в культуре клеток

Проводят последовательные 10-ти кратные разведения вируса в стерильных культуральных 96-луночных планшетах. Для этого во все лунки планшета вносят по 0,09 $см^3$ питательной среды для постановки РН. В первые лунки (A1-D1) вносят 0,01 $см^3$ исходной вируссодержащей суспензии, наконечники меняют. Затем проводят перемешивание вируса многоканальным дозатором с четырьмя наконечниками, переносят во второй ряд по 0,01 $см^3$ и так далее, меняя их при каждом переносе. Из последнего ряда производят сброс вируссодержащего материала в объеме 0,01 $см^3$ в дезинфицирующий раствор. Затем во все лунки вносят по 0,1 $см^3$ клеточной суспензии с концентрацией клеток 200 000—250 000 кл/$см^3$ в ростовой питательной среде.

Планшеты закрывают крышкой и помещают в CO_2 инкубатор (с концентрацией CO_2 5 %) при температуре (37 ± 1) °С на 3—7 сут. После чего проводят учет результатов. Расчет результатов титрования исходного вируса по Керберу проводят согласно формуле

$$\lg ИД_{50} = \lg D + \frac{\lg d}{2} - \lg d \sum \frac{r}{n},$$

где D — высшее разведение вируса, еще дающее 100 %-ный эффект (ЦПД в культуре клеток);

d — коэффициент разведения;

r — количество положительно реагирующих тест-объектов на каждое разведение;

n — количество зараженных тест-объектов на каждое заражение;

$\sum \frac{r}{n}$ — сумма отношений, положительно реагирующих тест-объектов к зараженным для всех разведений, дающих эффект от 0 до 100 %.

За титр вируса принимают наивысшее его разведение, дающее $1ИД_{50}/0{,}1$ $см^3$ и поражающее 50 % тест-объектов (ЦПД в культуре клеток).

Примеры титрования вируса и учет результатов инфекционного титра вируса по Керберу приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 — Титрование вируса и учет результатов инфекционного титра вируса по Керберу (вариант 1)

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
A	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
B	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
C	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
D	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
E	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК
F	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК
G	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК
H	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК

Примечание — В данной таблице приведены следующие обозначения:
КК — контроль культуры клеток (ЦПД -отсутствует);
«+» — наличие ЦПД;
«–» — отсутствие ЦПД.

$$\lg ИД_{50} = \lg 10^{-4} + \frac{\lg 10}{2} - \lg 10\left(\frac{0}{4} + \frac{3}{4} + \frac{2}{4} + \frac{4}{4}\right) = -4 + 0{,}5 - \frac{9}{4} = -4 + 0{,}5 - 2{,}25 = -5{,}75$$

В данном варианте инфекционный титр вируса составил 5,75 lg $ТЦД_{50}/0{,}1см^3$.

Таблица 4 — Титрование вируса и учет результатов инфекционного титра вируса по Керберу (вариант 2)

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
A	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
B	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
C	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
D	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
E	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК
F	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК
G	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК
H	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК	КК

Примечание — В данной таблице приведены следующие обозначения:
КК — контроль культуры клеток (ЦПД отсутствует);
«+» — наличие ЦПД;
«–» — отсутствие ЦПД.

В данном варианте инфекционный титр вируса составил 6,0 lg $ТЦД_{50}$/0,1 $см^3$.

7.2.9 Подготовка рабочей дозы вируса 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$

Необходимую рабочую дозу вируса 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$ готовят, используя один из следующих способов.

1-й способ

Дозу вируса 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$ готовят по формуле

$$c = \frac{a}{2b},$$

где a — титр вируса в anti lg в 0,1 $см^3$;

b — рабочая доза вируса в 0,1 $см^3$;

c — искомое разведение вируса в 0,1 $см^3$.

Пример — В первом варианте инфекционный титр вируса составил 5,75 lg $ТЦД_{50}$/0,1$см^3$, что соответствует anti lg $10^{5,75}$ $ТЦД_{50}$/0,1$см^3$ = 562 341 $ТЦД_{50}$/0,1$см^3$. Согласно формуле, искомое разведение вируса составляет: 562 341/350×2 = 803 раза. Для приготовления рабочей дозы вируса берут 1 часть цельного вируса и 802 части питательной среды для РН (например, 0,1 $см^3$ цельного вируса и 80,2 $см^3$ питательной среды для РН).

Пример — Во втором варианте инфекционный титр вируса составил 6 lg $ТЦД_{50}$/0,1$см^3$, что соответствует anti lg 10^6 $ТЦД_{50}$/0,1$см^3$ = 1 000 000 $ТЦД_{50}$/0,1$см^3$. Согласно формуле, искомое разведение вируса составляет: 1 000 000/312,5×2 = 1 600 раз. Для приготовления рабочей дозы вируса берут 1 часть цельного вируса и 1 599 части питательной среды для РН (например, 0,1 $см^3$ цельного вируса и 159,9 $см^3$ питательной среды для РН).

2-й способ

Во втором варианте определили, что 1 $ИД_{50}$/0,1 $см^3$ находится в разведении 10^{-6}, соответственно 10 $ИД_{50}$/0,1 $см^3$ находится в разведении 10^{-5}, 100 $ИД_{50}$/0,1 $см^3$ — в разведении 10^{-4}, 1 000 $ИД_{50}$/0,1 $см^3$ — в разведении 10^{-3}. Готовят необходимое количество рабочей дозы вируса (например, из разведения 10^{-3} берут 1 часть и разводят в 1,6 раз питательной среды для РН).

Пример — Берут 3,75 $см^3$ вируса из разведения 10^{-3} и соединяют с 6,25 $см^3$ питательной среды для РН и получают 625 $ИД_{50}$/0,1 $см^3$, что соответствует 312,5 $ТЦД_{50}$/0,1$см^3$.

7.3 Постановка реакции нейтрализации микрометодом

Реакцию нейтрализации микрометодом выполняют в 96-луночных стерильных культуральных планшетах с использованием культуры клеток ПТ-80.

7.3.1 Исследуемую сыворотку крупного рогатого скота инактивируют при (56 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин на водяной бане или в сухожаровом шкафу с принудительной вентиляцией. Каждый образец исследуют в четырех повторах. Для этого во все лунки четырех горизонтальных рядов культурального планшета вносят по 0,05 $см^3$ питательной среды для постановки РН. В первые четыре лунки ряда A_1 — D_1 вносят 0,05 $см^3$ исследуемой сыворотки крови и готовят двукратные разведения, удаляя из последней лунки 0,05 $см^3$ в дезинфицирующий раствор (пример первичного протокола представлен в приложении Б).

В случае проведения скрининга испытуемые сыворотки допускается исследовать только в разведении 1:8 в четырех повторах каждую (пример первичного протокола представлен в приложении В).

В каждую лунку с исследуемыми сыворотками добавляют по 0,05 $см^3$ рабочей дозы вируса, содержащей 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$. Инкубируют в течение 1 ч в CO_2 инкубаторе (с концентрацией CO_2 5 %) при температуре (37 ± 1) °С в закрытых планшетах. Затем в каждую лунку вносят по 0,1 $см^3$ клеточной суспензии с концентрацией клеток 200 000—250 000 кл/ $см^3$ в ростовой питательной среде. Перемешивают, а затем закрывают планшеты крышками и выдерживают в CO_2 инкубаторе (с концентрацией CO_2 5 %) при (37 ± 1) °С 3—7 сут. Планшеты ежедневно просматривают под инвертированным микроскопом на наличие ЦПД.

7.3.2 Одновременно ставят контроли реакции. Пример титрования отрицательной и положительной сывороток, постановка контроля рабочей дозы вируса и контроля культуры клеток представлен в таблице 5.

Таблица 5 — Пример титрования отрицательной и положительной сывороток, постановка контроля рабочей дозы вируса и контроля культуры клеток

Разведение сывороток	SS^+	SS^+	SS^+	SS^+	NS	NS	NS	NS	КК	КК	КК	КК
1:256	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
1:128	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
1:64	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
1:32	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–
1:16	–	–	–	–	+	+	+	+	КРД 10^{-4} –	КРД 10^{-4} –	КРД 10^{-4} –	КРД 10^{-4} –
1:8	–	–	–	–	+	+	+	+	КРД 10^{-3} –	КРД 10^{-3} –	КРД 10^{-3} –	КРД 10^{-3} –
1:4	–	–	–	–	+	+	+	+	КРД 10^{-2} +	КРД 10^{-2} +	КРД 10^{-2} +	КРД 10^{-2} +
1:2	–	–	–	–	+	+	+	+	КРД 10^{-1} +	КРД 10^{-1} +	КРД 10^{-1} +	КРД 10^{-1} +

Примечание — В данной таблице приведены следующие обозначения:
«+» — наличие ЦПД;
«–» — отсутствие ЦПД (сохранение монослоя);
титр положительной сыворотки (SS^+) — 1:64;
NS — отрицательно;
контроль культуры клеток (КК) — отрицательно;
КРД — контроль рабочей дозы вируса.

Постановка контролей (положительного и отрицательного) аналогична алгоритму исследования испытуемых сывороток крови по 7.3.1.

Для контроля рабочей дозы вируса в четыре ряда вносят по 0,09 $см^3$ питательной среды для постановки РН. В первые лунки вносят по 0,01 $см^3$ вируссодержащей суспензии с рабочей дозой вируса 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$. Проводят титрование вируса многоканальным дозатором с четырьмя наконечниками, меняя их при каждом переносе. Из последнего ряда производят сброс вируссодержащей суспензии в объеме 0,01 $см^3$ в дезинфицирующий раствор. Затем во все лунки вносят по 0,1 $см^3$ клеточной суспензии с концентрацией клеток 200 000—250 000 кл/$см^3$ в ростовой питательной среде.

Для контроля культуры клеток в лунки вносят 0,1 $см^3$ питательной среды и 0,1 $см^3$ суспензии культуры клеток в ростовой питательной среде не менее чем в четырех повторах. На момент учета реакции во всех лунках должен быть сохранен монослой без признаков дегенерации (см. рисунок 4).



Рисунок 4 — Перевиваемая культура клеток ПТ-80 в норме (увеличение 100^X)

7.4 Учет и интерпретация результатов

Результаты учитывают, если рабочая доза вируса находится в пределах 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$. Стандартная положительная сыворотка должна быть в титре 1:8 и выше. Негативная сыворотка не должна нейтрализовать действие вируса в титре выше, чем 1:4.

Исследуемую сыворотку оценивают положительно, если она содержит специфические к вирусу ВД антитела в титре 1:8 и выше.

Пример результата титрования исследуемой сыворотки представлен в таблице 6.

Таблица 6 — Результат реакции нейтрализации испытуемой сыворотки крови

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
A	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
B	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
C	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
E												
F												
G												
H												

Примечание — В данной таблице приведены следующие обозначения:
«+» — наличие ЦПД;
«–» — отсутствие ЦПД (сохранение монослоя).

Чтобы рассчитать, в каком разведении сыворотка защищает 50 % клеточного монослоя от действия 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$ вируса ВД, используется формула Кербера

$$lgИД_{50} = lgD + \frac{lgd}{2} - lgd\sum\frac{r}{n},$$

где $ИД_{50}$ — искомое разведение сыворотки;

D — высшее разведение сыворотки, еще дающее 100 %-ный эффект защиты монослоя от действия вируса (ЦПД в культуре клеток отсутствует);

d — коэффициент разведения;

$\sum\frac{r}{n}$ — сумма отношений, положительно реагирующих тест-объектов к зараженным для всех разведений, дающих эффект от 0 до 100 %;

r — количество положительно реагирующих тест-объектов на каждое разведение;

n — количество зараженных тест-объектов на каждое заражение.

Пример — Подставляем в формулу значения из таблицы 6. В данном примере D находится в разведении 1:8, что соответствует числу 0,125. Переводим 0,125 в десятичный логарифм: log_{10} 0,125 = –0,9, что соответствует $10^{-0,9}$ ($lg10^{-0,9}$).

$$lgИД_{50} = lg10^{-0,9} + \frac{lg2}{2} - lg2\left(\frac{0}{4}+\frac{1}{4}+\frac{2}{4}+\frac{2}{4}+\frac{3}{4}+\frac{4}{4}\right) = -0,9 + \frac{0,3}{2} - 0,3\frac{12}{4} = -0,9 + 0,15 - 0,3\cdot 3,0 = -0,75 - 0,900 = -1,65$$

Значит, сыворотка в разведении $10^{-1,65}$ = 1 : $10^{1,65}$ защищает 50 % клеточного монослоя от действия 300—350 $ТЦД_{50}$/0,05 $см^3$ вируса вирусной диареи. По таблице антилогарифмов находим титр сыворотки. Он равен 1 : $10^{1,65}$ = 1 : 44,6. Следовательно, титр антител в сыворотке в нашем примере составил Т = 1 : 44,6.

8 Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ позволяет выявлять специфические антитела к вирусу вирусной диареи крупного рогатого скота как к структурным (E1, E2, E^{rns}), так и к неструктурным белкам (p80/125).

8.1 Иммуноферментный анализ

8.1.1 Для образцов сыворотки крови, конкурентный

Метод основан на конкурентном взаимодействии конъюгированных с пероксидазой хрена моноклональных антител к белку p80/125 вируса диареи КРС и сывороточных вирусспецифических антител с иммобилизованным в лунках планшета антигеном вируса диареи.

При отсутствии в исследуемой сыворотке крови вирусспецифических антител моноклональный конъюгат свободно взаимодействует с иммобилизованным в лунке антигеном вируса диареи КРС, и после добавления ТМБ в лунке развивается окраска.

Если исследуемая сыворотка крови содержит вирусспецифические антитела, происходит их взаимодействие с иммобилизованным антигеном, его частичная или полная блокировка. В результате чего связывание антител конъюгата с антигеном не происходит или происходит частично и соответственно окрашивание отсутствует или интенсивность окраски снижается.

Таким образом, интенсивность окраски обратно пропорциональна количеству антител в исследуемом образце.

8.1.2 Для образцов молока, непрямой

Антиген вируса диареи КРС, сорбированный в лунках микропанели, образует комплекс со специфическими антителами, содержащимися в образцах молока КРС, который взаимодействует с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом против IgG КРС.

Пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромаген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации специфических антител в исследуемом образце молока.

8.2 Оборудование, материалы и реактивы

Используют следующие оборудование, материалы и реактивы:

мерную лабораторную посуду ГОСТ 1770 различной вместимости класса не ниже 2;

спектрофотометр с вертикальным лучом света для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм;

автоматические/механические дозаторы переменного объема;

секундомер/таймер;

термостат, обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С;

центрифугу лабораторную со скоростью вращения ротора 2000—3000 об/мин;

холодильник, обеспечивающий поддержание температуры от 4 °С до 8 °С;

лабораторную водяную баню с терморегулятором с температурой нагрева до 100 °С;

автоматическое/механическое устройство для промывания планшет;

набор для выявления антител к вирусу диареи крупного рогатого скота иммуноферментным методом, в состав которого входят следующие компоненты:

- планшет для иммуноферментного анализа с адсорбированным в лунках специфическим антигеном вируса диареи крупного рогатого скота;
- положительный контроль для сыворотки крови ($К^+$ сыв), содержит антитела к ВДКРС;
- отрицательный контроль для сыворотки крови ($К^-$ сыв), не содержит антитела к ВДКРС;
- положительный контроль для молока ($К^+$ мол), содержит антитела к ВДКРС;
- положительный контроль для молока ($К^+$ мол), не содержит антитела к ВДКРС;
- конъюгат для исследования сыворотки крови (моноклональные антитела к белку р80/125 ВДКРС);
- конъюгат для исследования молока (моноклональные антитела к IgG КРС);
- промывочный буфер (ФСБТ);
- субстратный раствор (ТМБ);
- стоп-раствор (1М серная кислота);

воду дистиллированную по ГОСТ Р 58144;

наконечники к дозаторам;

бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов и наборов, по качеству не ниже вышеуказанных.

Примечание — Для проведения ИФА допускается применять коммерческие тест-системы, работу с которыми проводят в соответствии с инструкциями производителей после верификации в лаборатории.

8.3 Подготовка к исследованию

8.3.1 Подготовка биологического материала

Для подготовки замороженные образцы сывороток крови нагревают в течение 5—10 мин на водяной бане при температуре (37 ± 1) °С и случае выпадения осадка осветляют центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об/мин.

В реакции образцы сыворотки крови используют в разведении 1:5 в буферном растворе.

Для подготовки замороженные образцы молока нагревают в течение 5—10 мин на водяной бане при температуре (37 ± 1) °С. Перед анализом образцы должны быть обезжирены путем центрифугирования в течение 10 мин при 2000—3000 об/мин. Вместо центрифугирования образцы можно выдержать в холодильнике минимум 16 ч. Пипеткой отбирают жидкость для анализа из-под слоя сливок.

8.3.2 Подготовка рабочих растворов

Перед началом работы все реагенты, за исключением конъюгата, выдерживают не менее 30 мин при комнатной температуре (22 ± 3) °С и перемешивают.

Рабочий раствор буфера для отмывания планшетов (ФСБТ). Содержимое флакона (компонент 8) разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой.

Пример — Для получения 500 $см^3$ рабочего раствора к 25 $см^3$ концентрата добавить 475 $см^3$ воды.

Рабочий раствор ФСБТ стабилен при температуре 4 °С в течение 3 сут. Для более длительного хранения раствор замораживают и хранят при температуре минус 20 °С.

Буфер для разведения образцов и конъюгата (БР) представляет собой рабочий раствор ФСБТ.

Рабочий раствор конъюгата для сывороток крови (компонент 6) и для молока (компонент 7): 100-кратный концентрат конъюгата разводят БР в соотношении 1:100.

Пример — Для приготовления 10 см^3 рабочего раствора конъюгата, рассчитанного на один планшет, к 9,9 см^3 БР добавляют 0,1 см^3 100-кратного концентрата конъюгата.

Конъюгат следует разводить непосредственно перед использованием. 100-кратный концентрат конъюгата должен находиться при температуре от 2 °С до 8 °С.

Контрольные образцы сывороток крови (компоненты 2 и 3) используют в реакции, разведенными в БР в соотношении 1:5.

Контрольные образцы молока (компоненты 4 и 5), субстратный раствор (компонент 6) и стоп-раствор (компонент 10) — готовы к применению.

8.4 Проведение анализа образцов сыворотки крови

8.4.1 В четыре лунки планшета вносят по 0,1 см^3 разведенных в БР 1:5 контрольных образцов сывороток крови $К^+$ и $К^-$ (в двух повторах).

В остальные лунки планшета вносят по 0,1 см^3 исследуемых образцов сывороток крови, разведенных в БР в соотношении 1:5. (Сыворотки можно разводить непосредственно в лунках планшета: к 0,08 см^3 БР добавляют 0,02 см^3 образца, тщательно перемешивая содержимое лунок).

Стрипы закрывают липкой пленкой и инкубируют 1 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С.

Не промывая планшет, в каждую лунку с сывороткой крови добавляют по 0,05 см^3 конъюгата для сыворотки. Содержимое лунок осторожно перемешивают. Инкубируют 1 ч при комнатной температуре (22 ± 3) °С.

8.4.2 После окончания инкубации планшет пять раз промывают рабочим раствором ФСБТ на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (по 0,3 см^3 на лунку). Затем жидкость удаляют и планшет подсушивают постукиванием по фильтровальной бумаге.

8.4.3 В каждую лунку вносят по 0,1 см^3 ТМБ, инкубируют 15 мин при комнатной температуре в темноте.

8.4.4 Реакцию останавливают внесением по 0,1 см^3 стоп-раствора в каждую лунку.

Для определения титра положительного образца сыворотки крови в лунках стрипа готовят серию двукратных разведений в БР (от 1:5 — 1:640). В ряд А вносят 0,16 см^3 БР, добавляют 0,04 см^3 исследуемой сыворотки. Тщательно перемешивают. В остальные лунки стрипа вносят по 0,1 см^3 БР. Далее проводят последовательные разведения, перенося по 0,1 см^3 из предыдущей лунки в последующую. При этом используют две контрольные сыворотки в двух повторах.

8.5 Учет и интерпретация результатов

После остановки реакции (в течение 5 мин) проводят измерение оптической плотности субстратной смеси на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм ($А_{450}$).

Вычисляют средние арифметические значения оптической плотности контрольных образцов сывороток крови ($А_{450}К^+_{сыв}$) и ($А_{450}К^-_{сыв}$).

Результаты реакции считаются достоверными и могут быть учтены, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

($А_{450}К^+_{сыв}$) должна быть меньше 0,4

($А_{450}К^-_{сыв}$) должна быть больше 0,8

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если $А_{450}$ для контрольных образцов сывороток крови соответствуют вышеуказанным критериям, далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

Определяют отсекающие значения (Cut off):

Отрицательный Cut off = ($А_{450}К^-_{сыв}$) × 0,55

Положительный Cut off = ($А_{450}К^-_{сыв}$) × 0,5

Проводят интерпретацию результатов:

Вычисляют средние арифметические значения оптической плотности для каждого опытного образца ($А_{450}$ ОП) (если образцы исследовали в двух повторах).

Образец считают отрицательным, если $А_{450}$ ОП > отрицательного Cut off.

Образец считают положительным, если $А_{450}$ ОП < положительного Cut off.

Если $А_{450}$ ОП находится между значениями положительного Cut off и отрицательного Cut off, то результат считают сомнительным и анализ повторяют.

В случае, если образец титровался, титром антител считают последнее разведение сыворотки крови, для которого A_{450} ОП ≤ положительному Cut off.

8.6 Проведение анализа образцов молока

8.6.1 В четыре лунки планшета вносят по 0,1 $см^3$ контрольных образцов молока $К^+_{мол}$ и $К^-_{мол}$ (в двух повторах).

В остальные лунки вносят по 0,1 $см^3$ исследуемых образцов молока.

Стрипы закрывают липкой пленкой и инкубируют 45 мин в термостате при температуре (37 ± 1) °С.

8.6.2 После окончания инкубации планшет четыре раза промывают рабочим раствором ФСБТ на автоматическом промывочном устройстве или вручную, доверху заполняя лунки (по 0,3 $см^3$ на лунку). Затем жидкость удаляют и планшет подсушивают постукиванием по фильтровальной бумаге.

8.6.3 В каждую лунку вносят по 0,1 $см^3$ рабочего раствора конъюгата для молока. Инкубируют 30 мин в термостате при температуре (37 ± 1) °С.

8.6.4 Планшет пять раз промывают рабочим раствором ФСБТ по 8.6.2.

8.6.5 В каждую лунку вносят по 0,1 $см^3$ ТМБ, инкубируют 15 мин при комнатной температуре в темноте.

8.6.6 Останавливают реакцию внесением по 0,1 $см^3$ стоп-раствора.

8.7 Учет и интерпретация результатов

После остановки реакции проводят измерение оптической плотности субстратной смеси на спектрофотометре с вертикальным лучом при длине волны 450 нм (A_{450}).

Вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности контрольных образцов молока (A_{450} $К^+_{мол}$) и (A_{450} $К^-_{мол}$).

Результаты реакции считаются достоверными, если контрольные показатели соответствуют следующим критериям:

(A_{450} $К^+_{мол}$) должен быть больше 0,8

(A_{450} $К^-_{мол}$) должен быть меньше 0,25

Если полученные значения не соответствуют вышеуказанным критериям, результаты ИФА считают недостоверными и реакцию повторяют. Если A_{450} для контрольных образцов соответствуют вышеуказанным критериям, далее проводят оценку результатов реакции в лунках с испытуемыми образцами.

Для интерпретации результатов вычисляют среднее арифметические значения оптической плотности для каждого опытного образца (A_{450} ОП) (если образец исследовали в двух повторах).

Определяют для каждого образца относительное содержание антител

$S/P = A_{450}$ ОП/A_{450} $К^+_{мол}$.

Если S/P ≥ 0,3 — образец молока считают положительным

Если S/P ≤ 0,3 — образец молока считают отрицательным

9 Выделение вируса вирусной диареи крупного рогатого скота в первичной культуре клеток

Сущность метода заключается в выделении и накоплении вируса вирусной диареи КРС в чувствительной первичной культуре клеток с последующей его идентификацией методом ОТ-ПЦР. Выделение вируса проводят в течение трех последовательных пассажей. Метод универсален для обнаружения двух биотипов вируса: цитопатогенного и нецитопатогенного.

9.1 Оборудование, материалы и реактивы

Используют следующие оборудование, материалы и реактивы:

автоматические/механические дозаторы переменного объема;

секундомер/таймер;

камеру Горяева или автоматический счетчик клеток;

весы неавтоматического действия класса точности не ниже II по ГОСТ OIML R 76-1;

CO_2 — инкубатор с температурой нагрева (37 ± 1) °С (с концентрацией CO_2 5 %);

лабораторную водяную баню с терморегулятором с температурой нагрева до 100 °С;

сухожаровой шкаф с принудительной вентиляцией, обеспечивающий поддержание температуры (56 ± 1) °С;

центрифугу настольную с частотой вращения от 800 до 3000 об/мин;
холодильник, обеспечивающий поддержание температуры от 4 °С до 8 °С;
холодильник, обеспечивающий поддержание температуры минус (20 ± 1) °С;
низкотемпературный морозильник, обеспечивающий поддержание температуры минус 70 °С и ниже, либо сосуд Дьюара с жидким азотом;
инвертированный микроскоп;
ламинарный бокс II А класса биобезопасности;
фарфоровые ступки с пестиками по ГОСТ 9147 или гомогенизатор;
магнитную мешалку с диапазоном скорости вращения от 10 об/мин и выше, обеспечивающая поддержание температуры (37 ± 1) °С;
среду «Игла МЕМ с солями Хенкса с двойным набором аминокислот и витаминов»;
сыворотку фетальную крупного рогатого скота (эмбриональную телячью);
раствор Версена 0,02 %-ный;
раствор Хенкса;
химопсин 50 мг/фл;
раствор трипсина 0,25 %-ный;
L-аргинин для культуральных работ;
L-глутамин стерильный;
раствор HEPES 1М, pH 7,2—7,4;
0,4 %-ный раствор трипанового синего;
пенициллин;
стрептомицин;
раствор натрия хлорида стерильный 0,9 %-ный изотонический (физиологический раствор) по ГОСТ 10444.1;
ГРМ-бульон;
ГРМ-агар;
агар Сабуро;
тестикулы бычка;
спирт этиловый по ГОСТ 5962;
фильтрующие насадки для шприцев, с диаметром пор 0,45 мкм;
фильтрующие насадки для шприцев, с диаметром пор 0,22 мкм;
стерильные центрифужные пробирки;
шприцы по ГОСТ ISO 7886-1;
кварцевый песок;
стерильные чашки Петри по ГОСТ 25336;
культуральные стерильные матрасы;
культуральные стерильные планшеты;
стерильные наконечники с фильтром к дозаторам;
магнит (якорь) цилиндрический для магнитной мешалки;
медицинские инструменты (пинцет, ножницы).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов и наборов, по качеству не ниже вышеуказанных.

Для контроля на бактериальную и грибковую контаминацию допускается применение других питательных сред, приготовленных по прописи производителя, с проверенными ростовыми свойствами и по качеству не ниже вышеуказанных.

Примечание — Для проведения вирусовыделения допускается применение других методик после верификации в лаборатории.

9.2 Подготовка к исследованию

9.2.1 Подготовка фетальной сыворотки по 7.2.1

9.2.2 Получение первичной культуры клеток ТБ

Первичную культуру клеток готовят из тестикул бычков двух-, трехмесячного возраста, которые доставляют в течение 2—3 ч в мошонке с перевязанными семенными канатиками.

Кожу мошонки фламбируют на весу, после этого стерильными ножницами срезают кончик кожи и, подтягивая тестикул за семенной канатик, извлекают его. После извлечения тестикулы помещают на стерильную чашку Петри, удаляют с них оболочку, разрезают вдоль и вылущивают содержимое в стерильную стеклянную плоскодонную лабораторную посуду с крышкой. Ткань тестикулов тщательно промывают рабочим раствором Хенкса с антибиотиками (смесью пенициллина — 200 ЕД и стрептомицина — 200 мкг на 1 $см^3$ раствора Хенкса или антибиотиками широкого спектра действия согласно инструкции производителя). Измельченную ткань ТБ промывают тем же раствором до просветления жидкости. Далее максимально удаляют раствор Хенкса с антибиотиками и добавляют один из растворов для трипсинизации (0,25 %-ный раствор трипсина или раствор Версена 0,02 %-ный с добавлением химопсина (100 мг химопсина на 500 $см^3$ раствора Версена 0,02 %-ного). Соотношение ткани и раствора для трипсинизации 1:10 — 1:15. Колбу ставят на магнитную мешалку (16—20 об/мин). Дезагрегацию ткани производят при температуре (37 ± 1) °С, дробно, до полного истощения ткани, т. е. через каждые 10—15 мин производят слив взвеси клеток в стерильную пробирку и помещают в холодильник. Дезагрегацию ткани можно производить при температуре от 4 °С до 8 °С в течение 12—18 ч на магнитной мешалке (16—20 об/мин). Собранную взвесь клеток центрифугируют при 800—1000 об/мин в течение 10—11 мин (рекомендовано использовать центрифугу с охлаждением от 4 °С до 8 °С). Надосадочную жидкость сливают и отбирают образец для подсчета клеток. После подсчета клеток по 7.2.4 концентрированную суспензию клеток разводят ростовой средой до посадочной концентрации (см. таблицу 7). Матрасы помещают в CO_2 инкубатор (с концентрацией CO_2 5 %) при температуре (37 ± 1) °С. Через сутки сменяют ростовую среду (классификация питательных сред в соответствии со способом их применения приведена в приложении А). Монослой формируется на 2—3 сут.

Примечание — Необходимо контролировать трипсин и химопсин на контаминацию вирусом вирусной диареи методом ОТ-ПЦР.

Таблица 7 — Посадочная концентрация клеток и объем вносимой клеточной суспензии

Культуральная посуда	Концентрация клеточной суспензии, тыс./$см^3$	Объем вносимой клеточной суспензии, $см^3$
6-луночные планшеты	800 000—900 000	2
12-луночные планшеты	800 000—900 000	1
24-луночные планшеты	800 000—900 000	0,5
Культуральные матрасы, 25$см^3$	300 000—400 000	10

9.2.3 Контроль культуры клеток тестикул бычка на контаминацию вирусом вирусной диареи

Перед началом исследований полученную суспензию клеток (не менее 900 000 клеток) проверяют на контаминацию вирусом вирусной диареи методом ОТ-ПЦР. Если по результатам исследования выявлен генетический материал вируса ВД КРС, то культура клеток не допускается для дальнейшей работы.

9.2.4 Поддержание субкультуры

Пересев культуры клеток производят по 7.2.3 с периодичностью один раз в три дня и коэффициентом 1:2.

9.2.5 Хранение культуры клеток

Допускается хранение культуры клеток по 7.2.6.

9.2.6 Подготовка образцов

После доставки биологического материала в лабораторию для вирусовыделения образцы замораживают при минус 70 °С и ниже и оттаивают при (37 ± 1) °С на водяной бане.

Флаконы с тампонами встряхивают, тампоны тщательно отжимают, а транспортную среду осветляют центрифугированием при 1500—3000 об/мин в течение 15—20 мин для получения надосадочной жидкости.

Флаконы с соскобами центрифугируют при 1500—3000 об/мин в течение 10 мин. Затем из осадка готовят 10 %-ную суспензию с добавлением стерильного физиологического раствора. Далее полученную суспензию центрифугируют при 1500—3000 об/мин в течение 15—20 мин для получения надосадочной жидкости.

Патологический материал и фекалии растирают в гомогенизаторе в течение 2—5 мин на максимальной скорости или в ступке со стерильным кварцевым песком с добавлением стерильного физио-

логического раствора для получения 10 %-ной суспензии. Полученную суспензию центрифугируют при 1500—3000 об/мин в течение 15—20 мин для получения надосадочной жидкости.

Для исследования спермы ее разбавляют в соотношении 1:10 стерильным физиологическим раствором или питательной средой «Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов». Полученную суспензию центрифугируют при 1500—3000 об/мин в течение 15—20 мин для получения надосадочной жидкости.

Надосадочную жидкость отсасывают в стерильные пробирки. Пропускают через фильтрующую насадку для шприцев, с диаметром пор 0,45 мкм, затем через насадки с диаметром пор 0,22 мкм (дополнительная обработка антибиотиками не требуется). Затем материал подвергают контролю на наличие бактерий и грибов путем посева на ГРМ-агаре, ГРМ-бульоне и агаре Сабуро. После получения отрицательного результата биологический материал используют для заражения. В случае положительного результата суспензию биоматериала подвергают дополнительной обработке (фильтрации) и повторно ставят контроли. Надосадочную жидкость допускается хранить в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 4 сут. Более длительное хранение осуществляется при температуре минус 70 °С и ниже, вплоть до конца исследования. В день заражения исследуемый материал оттаивают и повторно центрифугируют при 1500—3000 об/мин в течение 15—20 мин.

Цельная кровь не требует пробоподготовки.

9.3 Выделение вируса ВД крупного рогатого скота в первичной культуре клеток ТБ

Для выделения вируса используют монослой первичной культуры клеток ТБ или ее субкультуру. Для этого удаляют ростовую среду, промывают монослой трехкратно питательной средой и вносят надосадочную жидкость исследуемого образца в объеме 0,2—0,3 $см^3$. При проведении исследования используют не менее четырех тест — объектов для одного образца.

После адсорбции в течение 1 ч при температуре (37 ± 1) °С в CO_2 инкубаторе (с концентрацией CO_2 5 %) культуру клеток промывают питательной средой и вносят питательную среду для РН с добавлением 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (см. таблицу 8).

Примечание — Не допускается высыхания монослоя в планшетах.

Таблица 8 — Объемы вносимой надосадочной жидкости исследуемого образца и питательной среды

Культуральная посуда	Объем вносимой надосадочной жидкости исследуемого образца, $см^3$	Объем вносимой питательной среды для РН с добавлением 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, $см^3$
6-луночные планшеты	0,2—0,3	2
12-луночные планшеты		1
24-луночные планшеты		0,5
Культуральные матрасы, 25 $см^3$		10

Контролем служат незараженные культуры клеток (см. рисунок 5). В случае постановки контролей в культуральных планшетах, используют не менее четырех тест-объектов; если в матрасе, то достаточно одного.

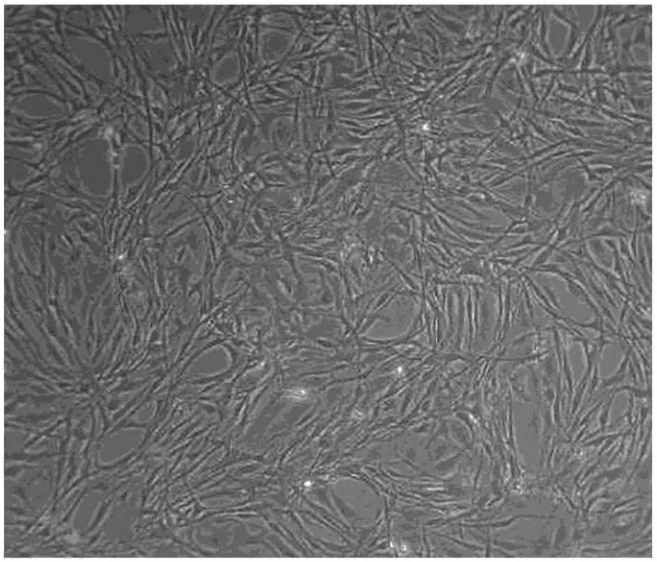

Рисунок 5 — Первичная культура клеток ТБ в норме (увеличение 100^{X})

Культуры клеток зараженные и контрольные просматривают под инвертированным микроскопом один раз в день до семи дней для учета изменений в монослое.

ЦПД вируса ВД проявляется мелкозернистой инфильтрацией, вакуолизацией в перинуклеарной зоне, округлением, уменьшением клеток в размере. Клетки располагаются группами или диффузно, их количество нарастает до полного отслоения от субстрата (см. рисунки 2, 3). Возможно выделение нецитопатогенных штаммов.

При наличии ЦПД в культуре клеток проводят идентификацию выделенного изолята методом ОТ-ПЦР. При отсутствии ЦПД так же проводят исследования методом ОТ-ПЦР на наличие генетического материала вируса ВД КРС нецитопатогенного биотипа.

Если после первого пассажа результаты ОТ-ПЦР отрицательные, то делают последующие пассажи с контролем методом ОТ-ПЦР после каждого пассажа. Для этого культуру клеток замораживают при минус 70 °С и ниже и оттаивают при (37 ± 1) °С на водяной бане. Затем осветляют центрифугированием при 1500—3000 об/мин в течение 15—20 мин. Надосадочную жидкость используют для очередного пассажа. Часть образца надосадочной жидкости после каждого пассажа хранят при температуре минус 70 °С и ниже, вплоть до конца исследования.

9.4 Учет и интерпретация результатов

Вирус считается не выделенным, если после всех трех проведенных пассажей не будет обнаружен генетический материал вируса ВД КРС методом ОТ-ПЦР.

Вирус считается выделенным, если после любого пассажа будет обнаружен генетический материал вируса ВД КРС методом ОТ-ПЦР.

10 Выявление РНК вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции

Метод выявления РНК вируса диареи крупного рогатого скота основан на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с РНК внутреннего контрольного образца, проведении обратной транскрипции РНК, амплификации полученной кДНК и детекцией продуктов амплификации.

10.1 Оборудование, материалы и реактивы

Используют следующие оборудование, материалы и реактивы:

программируемый амплификатор (например, программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q, iCycler iQ/iQ5, CFX96);

весы неавтоматического действия класса точности не ниже II по ГОСТ OIML R 76-1;

автоматические/механические дозаторы переменного объема;

секундомер/таймер;

термостат для пробирок типа «Эппендорф», обеспечивающий поддержание температуры от 25 °С до 100 °С;

холодильник, обеспечивающий поддержание температуры от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;

микроцентрифугу для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования до 13 000 об/мин;

вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;

ламинарный бокс II А класса биобезопасности;

бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс);

центрифугу-вортекс;

инструменты для гомогенизации (фарфоровую ступку с пестиком по ГОСТ 9147) или гомогенизатор;

тест-систему для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»;

комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из биологического материала (например, «РИБО-преп»);

0,9 %-ный раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) ГОСТ 10444.1;

кварцевый песок;

одноразовые стерильные полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 $см^3$;

тонкостенные стерильные пробирки для ПЦР объемом 0,2 $см^3$ с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 $см^3$ в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками — при использовании прибора планшетного типа;

тонкостенные стерильные пробирки для ПЦР объемом 0,2 $см^3$ с плоской крышкой — при использовании прибора роторного типа;

завинчивающиеся крышки к пробиркам;

наконечники с фильтром к дозаторам;

наконечники без фильтра к дозаторам.

Примечание — Для постановки ПЦР необходимо использовать расходные материалы (пробирки, наконечники и др.), имеющие маркировку «свободные от нуклеаз».

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов, реактивов и наборов, по качеству не ниже вышеуказанных.

Примечание — Для экстракции НК и проведения ОТ-ПЦР допускается применять коммерческие тест- системы, работу с которыми проводят в соответствии с инструкциями производителей после верификации в лаборатории.

10.2 Подготовка образцов

Подготовку образцов к исследованию проводят согласно инструкции производителя (см. приложение Г).

10.3 Экстракция РНК из исследуемого материала

Выделение РНК проводят, руководствуясь инструкцией по применению набора реагентов, рекомендуемых производителем ПЦР тест-систем (например, инструкция по применению комплекта реагентов «РИБО-преп» для выделения РНК/ДНК из клинического материала представлена в приложении Д).

Экстракцию РНК из каждого исследуемого образца проводят в присутствии ВКО. Реакцию ОТ-ПЦР следует проводить сразу после получения РНК-образца.

10.4 Обратная транскрипция, амплификация и детекция продуктов амплификации

Молекулярно-генетическое исследование на вирусную диарею проводят, руководствуясь инструкцией по применению коммерческой тест-системы (например, инструкция по применению тест-системы «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной

цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» представлена в приложении Е).

Порядок работы приборов Rotor-Gene 3000/6000 и Rotor-Gene Q, iCycler iQ5 и iCycler iQ, CFX96 для проведения обратной транскрипции и амплификации с детекцией в режиме «реального времени» представлен в приложениях Ж, И, К.

10.5 Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят согласно инструкции производителя (пример интерпретации результатов с применением тест- системы «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» см. в приложении Л).

11 Реакция иммунофлуоресценции для обнаружения вирусных антигенов

Метод основан на специфическом взаимодействии ФИТЦ-иммуноглобулина с антигеном вируса вирусной диареи и дальнейшем выявлении комплекса с помощью люминесцентного микроскопа. ФИТЦ-иммуноглобулин представляет собой антитела к вирусу вирусной диареи крупного рогатого скота, меченные флуоресцеин изотиоцианатом.

ФИТЦ-иммуноглобулин предназначен для качественного обнаружения антигенов вируса вирусной диареи крупного рогатого скота в мазках со слизистых оболочек, мазках-отпечатках срезов органов, сперме, а также для контроля контаминации клеточных линий в реакции иммунофлуоресценции.

11.1 Оборудование, материалы и реактивы

Используют следующие оборудование, материалы и реактивы:

автоматические/механические дозаторы переменного объема;

секундомер/таймер;

термостат воздушный/инкубатор с регулировкой температуры на (37 ± 1) °С;

холодильник, обеспечивающий поддержание температуры от 2 °С до 10 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;

люминесцентный микроскоп;

магнитную мешалку с диапазоном скорости вращения от 10 об/мин и выше;

влажную камеру (закрывающийся контейнер с уложенной на дно увлажненной фильтровальной бумагой);

тест-систему «ФИТЦ-иммуноглобулин для диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота», в состав которой входят следующие компоненты:

- ФИТЦ-иммуноглобулин;
- 20-кратный концентрат буферного раствора для промывания образцов и разведения конъюгата (0,01 М ФСБ);

фильтровальную бумагу;

воду дистиллированную по ГОСТ Р 58144;

ацетон по ГОСТ 2603 или по ГОСТ 2768;

масло иммерсионное нефлуоресцирующее;

наконечники к дозаторам;

штатив-рельсы для окраски мазков;

магнит (якорь) цилиндрический для магнитной мешалки;

емкости для фиксации и промывания отпечатков (с держателями предметных стекол в вертикальном положении).

11.2 Подготовка к анализу

11.2.1 Подготовка препаратов мазков-отпечатков/мазков со слизистых оболочек

Мазки-отпечатки из исследуемых срезов органов готовят на тщательно обезжиренных предметных стеклах, высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Далее мазки-отпечатки/мазки со слизистых оболочек помещают в емкость для фиксации и фиксируют ледяным ацетоном в течение от 10 до 15 мин. После чего стекла высушивают и переходят к проведению РИФ.

11.2.2 Подготовка спермы

Неразбавленные образцы спермы разводят в физиологическом растворе в соотношении 1:10. Полученную суспензию центрифугируют при 1000—1500 об/мин в течение от 10 до 15 мин. Надосадочную жидкость удаляют. Весь осадок распределяют на предметное стекло, высушивают на воздухе при комнатной температуре. Далее фиксацию проводят по 11.2.1.

11.2.3 Подготовка препаратов из клеточных культур

При исследовании суспензии культуры клеток пробоподготовку проводят согласно по 11.2.2.

При исследовании монослоя клеточной культуры удаляют питательную среду и трехкратно промывают 0,01 М ФСБ. Далее фиксацию проводят согласно 11.2.1.

Примечание — Культуру клеток выращивают на предметных (например, применяют готовые коммерческие решения по выращиванию клеток на предметном стекле) или на покровных стеках (например, помещают покровные стекла в 6-луночные культуральные планшеты).

11.3 Подготовка рабочих растворов

11.3.1 Для приготовления рабочего раствора ФСБ содержимое флакона разводят в 20 раз свежеприготовленной дистиллированной водой.

Пример — Для приготовления 500 см^3 рабочего раствора ФСБ к 25 см^3 концентрата добавляют 475 см^3 дистиллированной воды.

11.3.2 Лиофилизированные препараты ФИТЦ-иммуноглобулина перед использованием выдерживают при комнатной температуре в течение (30 ± 2) мин, растворяют в стерильной дистиллированной воде (доводя объем до указанного на этикетке первоначального объема), далее разводят 0,01 М ФСБ до указанного на этикетке рабочего разведения.

Допускается аликвотирование. Аликвоты хранят при температуре минус (20 ± 1) °С до 14 сут.

11.4 Постановка реакции

Стекла с подготовленными мазками и клеточными культурами раскладывают на специальные штативы-рельсы для окраски так, чтобы они не касались друг друга. Штатив со стеклами помещают во влажную камеру (например, контейнер с выстланной на дне увлажненной фильтровальной бумагой). На всю поверхность мазков или монослоя культур клеток равномерно наносят по 0,1 см^3 рабочего разведения ФИТЦ-иммуноглобулина, закрывают камеру с препаратами и помещают на (30 ± 2) мин в термостат при температуре (37 ± 1) °С.

Для отмывания исследуемых образцов от не связавшихся или не специфически связавшихся ФИТЦ-иммуноглобулинов влажную камеру наполняют 0,01 М ФСБ и устанавливают на магнитную мешалку. Отмывание проводят в течение (20 ± 1) мин в темном месте при 200 об/мин, сменяя буфер через (10 ± 1) мин. После отмывания исследуемые образцы ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают на воздухе. Наносят нефлуоресцирующее иммерсионное масло и просматривают в люминесцентном микроскопе.

11.5 Учет результатов

Специфическую флюоресценцию учитывают в клетках эпителиального ряда. Она проявляется в виде яркого желто-зеленого свечения в ядрах клеток и перинуклеарной зоне цитоплазмы. Клетки, в которых не различаются ядро, а также дегенеративные клетки не учитывают. Оценку результатов микроскопии проводят по условной четырехкрестовой шкале при увеличении 100^X:

++++ — сверкающая, желто-зеленая флюоресценция клеток с очаговыми флюоресцирующими комплексами диффузного и гранулярного антигена в каждом поле зрения. Результат положительный (см. рисунок 6);

+++ — яркая, зеленая флюоресценция клеток с включениями в одном из 5—10 полей зрения. Результат положительный;

++ — яркая, зеленая флюоресценция клеток с включениями в одном из 10—50 полей зрения. Результат положительный;

+ — яркая, зеленая флюоресценция единичных клеток с включениями 3—5 клеток на весь мазок. Результат сомнительный требуется подтверждение методом ОТ-ПЦР;

— нечеткая, серо-зеленая тусклая диффузная флуоресценция клеток. Результат отрицательный (см. рисунок 7).

В случае затруднения интерпретации результата, а также при повреждении мазков или монослоя клеток более 40 % площади, необходимо провести повторное исследование методом флюоресцирующих антител или провести исследование другим методом (ОТ-ПЦР, выделение вируса в культуре клеток).

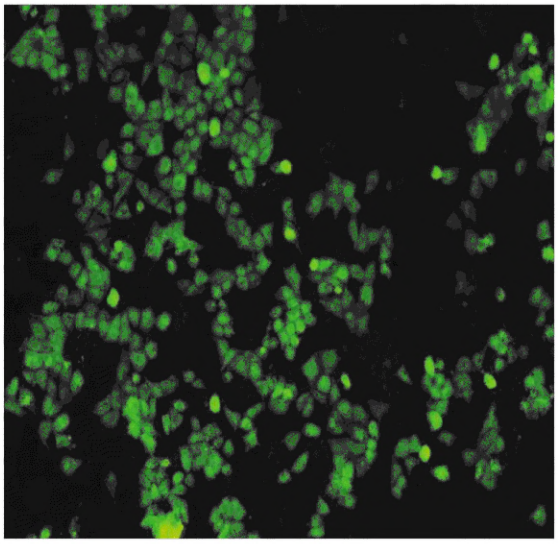

Рисунок 6 — Культура клеток ПТ-80, зараженная вирусом вирусной диареи (увеличение 100^{X})

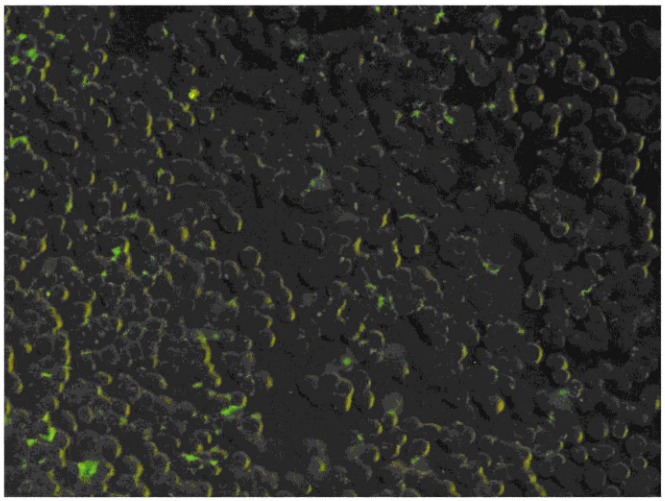

Рисунок 7 — Культура клеток ПТ-80, не зараженная вирусом вирусной диареи (увеличение 100^{X})

Приложение А
(обязательное)

Классификация питательных сред в соответствии со способом их применения (по составу) в данном документе

А.1 Питательная среда — питательная среда «Игла МЕМ с солями Хенкса с двойным набором аминокислот и витаминов» с содержанием 0,06 % L-глутамина (например, 300 мг L-глутамина на 500 $см^3$ питательной среды).

А.2 Ростовая питательная среда — питательная среда «Игла МЕМ с солями Хенкса с двойным набором аминокислот и витаминов» с содержанием 0,06 % L-глутамина (например, 300 мг L-глутамина на 500 $см^3$ питательной среды) и 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

А.3 Поддерживающая питательная среда — питательная среда «Игла МЕМ с солями Хенкса с двойным набором аминокислот и витаминов» с содержанием 0,06 % L-глутамина (например, 300 мг L-глутамина на 500 $см^3$ питательной среды) и 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

А.4 Питательная среда для постановки реакции нейтрализации — питательная среда «Игла МЕМ с солями Хенкса с двойным набором аминокислот и витаминов» с содержанием 0,06 % L-глутамина, 0,5 % L — аргинина и 1 % раствора HEPES.

Приложение Б
(справочное)

Первичный протокол при постановке реакции нейтрализации с титрованием исследуемой сыворотки крови

от « ____ »_____ 20___ г.

Шифр №

Номер лунок	1 1:2	2 1:4	3 1:8	4 1:16	5 1:32	6 1:64	7 1:128	8 1:256	9 1:512	10 1:1024	11 1:2048	12 1:4096
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
G	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

1—2 и т. д. — порядковые номера исследуемых сывороток крови.

Исполнитель:

Приложение В
(справочное)

Первичный протокол при постановке реакции нейтрализации без титрования исследуемой сыворотки крови

от « ____ »_____ 20___ г.

Шифр №

Номер лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 (1:8)	3 (1:8)	5 (1:8)	7 (1:8)	9 (1:8)	11 (1:8)	13 (1:8)	15 (1:8)	17 (1:8)	19 (1:8)	21 (1:8)	23 (1:8)
B	1 (1:8)	3 (1:8)	5 (1:8)	7 (1:8)	9 (1:8)	11 (1:8)	13 (1:8)	15 (1:8)	17 (1:8)	19 (1:8)	21 (1:8)	23 (1:8)
C	1 (1:8)	3 (1:8)	5 (1:8)	7 (1:8)	9 (1:8)	11 (1:8)	13 (1:8)	15 (1:8)	17 (1:8)	19 (1:8)	21 (1:8)	23 (1:8)
D	1 (1:8)	3 (1:8)	5 (1:8)	7 (1:8)	9 (1:8)	11 (1:8)	13 (1:8)	15 (1:8)	17 (1:8)	19 (1:8)	21 (1:8)	23 (1:8)
E	2 (1:8)	4 (1:8)	6 (1:8)	8 (1:8)	10 (1:8)	12 (1:8)	14 (1:8)	16 (1:8)	18 (1:8)	20 (1:8)	22 (1:8)	24 (1:8)
F	2 (1:8)	4 (1:8)	6 (1:8)	8 (1:8)	10 (1:8)	12 (1:8)	14 (1:8)	16 (1:8)	18 (1:8)	20 (1:8)	22 (1:8)	24 (1:8)
G	2 (1:8)	4 (1:8)	6 (1:8)	8 (1:8)	10 (1:8)	12 (1:8)	14 (1:8)	16 (1:8)	18 (1:8)	20 (1:8)	22 (1:8)	24 (1:8)
H	2 (1:8)	4 (1:8)	6 (1:8)	8 (1:8)	10 (1:8)	12 (1:8)	14 (1:8)	16 (1:8)	18 (1:8)	20 (1:8)	22 (1:8)	24 (1:8)

1—24 и т. д. — порядковые номера исследуемых сывороток крови.

Исполнитель:

Приложение Г
(справочное)

Подготовка образцов к исследованию методом ПЦР

Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 3800 об/мин (если кровь стояла при температуре от 2 °С до 8 °С более 1 ч после ее забора, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови).

Тканевой материал и соскобы гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10 %-ную суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию отстаивают при комнатной температуре в течение 15—30 мин или центрифугируют при 2000—3000 об/мин. Экстракцию РНК проводят из надосадочной жидкости.

Из фекалий готовят 10 %-ную суспензию на стерильном физиологическом растворе. Суспензию отстаивают в течение 5—10 мин, затем отбирают надосадочную жидкость и центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 мин. Экстракцию РНК проводят из надосадочной жидкости.

Образцы спермы смешивают в соотношении 1:4 с физиологическим раствором и центрифугируют при 13 000 об/мин в течение 10 мин, после чего удаляют надосадочную жидкость, оставив осадок и жидкую фракцию. Полученный материал используют для выделения РНК.

Образцы цельной крови, сыворотки крови, мазки со слизистых оболочек, молока и культур клеток не требуют предварительной подготовки.

Приложение Д
(справочное)

Инструкция по применению комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп»

Д.1 Состав комплекта реагентов «РИБО-преп»:

- раствор лизиса;
- раствор преципитации;
- раствор для отмывки 3;
- раствор для отмывки 4.

Д.2 Проведение анализа

Д.2.1 Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 °С до 8 °С) необходимо прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

Д.2.2 Нужно отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 $см^3$ с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения), далее внести в каждую пробирку по 0,01 $см^3$ ВКО[1)] (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции). Затем следует добавить в пробирки по 0,3 $см^3$ раствора для лизиса и промаркировать пробирки.

Д.2.3 В пробирки с раствором для лизиса и ВКО (если используется) необходимо внести по 0,1 $см^3$ подготовленных образцов, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения — внести 0,1 $см^3$ ОКО[1)]. В пробирку положительного контроля выделения внести 0,09 $см^3$ ОКО[1)] и 0,01 $см^3$ ПКО[1)] (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции).

Д.2.4 Содержимое пробирок следует тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.

Д.2.5 Нужно добавить в пробирки по 0,4 $см^3$ раствора для преципитации, перемешать на вортексе.

Д.2.6 Следует процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 000 об/мин.

Д.2.7 Необходимо аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца.

Д.2.8 Необходимо добавить в пробирки по 0,5 $см^3$ раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3—5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок; для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

Д.2.9 Нужно процентрифугировать пробирки при 13 000 об/мин в течение 1—2 мин на микроцентрифуге.

Д.2.10 Осторожно, не захватывая осадок, нужно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца.

Д.2.11 Необходимо добавить в пробирки по 0,2 $см^3$ раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3—5 раз.

Д.2.12 Нужно процентрифугировать пробирки при 13 000 об/мин в течение 1—2 мин на микроцентрифуге.

Д.2.13 Осторожно, не захватывая осадок, следует отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца.

Д.2.14 Необходимо поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

Д.2.15 Необходимо добавить в пробирки по 0,05 $см^3$ РНК-буфера, перемешать на вортексе, затем поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 0,090 $см^3$.

Д.2.16 Необходимо центрифугировать пробирки при 13 000 об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Образцы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК/ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 °С до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

[1)] Допускается изменение объема контрольных образцов, см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

Приложение Е
(справочное)

Инструкция по применению тест-системы «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

В состав входят следующие компоненты:
ПЦР-смесь-FL BVDV;
ПЦР-буфер-С;
полимераза (TaqF);
ТМ-Ревертаза (MMlv);
$К^+$ BVDV;
$К^-$;
RT-G-mix-2;
ОКО;
ВКО-V.

Общий объем реакции — 0,025 $см^3$, объем РНК-образца — 0,01 $см^3$.

Необходимо разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL BVDV, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций следует смешать в отдельной пробирке ПЦР-смесь-FL BVDV, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-ривертазу (MMlv) и RT-G mix-2 из расчета на каждую реакцию:

- 0,01 $см^3$ ПЦР-смеси-FL BVDV;
- 0,005 $см^3$ ПЦР-буфера-С;
- 0,0005 $см^3$ полимеразы (TaqF);
- 0,00025 $см^3$ ТМ-Ревертазы (MMlv);
- 0,00025 $см^3$ RT-G-mix-2.

Необходимо перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 0,015 $см^3$ в пробирки для ОТ-ПЦР.

Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки следует добавить по 0,01 $см^3$ образцов РНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов. Необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

Нужно поставить контрольные реакции:

- отрицательный контроль ПЦР ($К^-$) — в пробирку с реакционной смесью внести 0,01 $см^3$ $К^-$;
- положительный контроль ПЦР ($К^+$) — в пробирку с реакционной смесью внести 0,01 $см^3$ $К^+$ BVDV;
- отрицательный контроль экстракции (ОК) — в пробирку с реакционной смесью внести 0,01 $см^3$ пробы, экстрагированной из ОКО.

Приложение Ж
(справочное)

Обратная транскрипция и амплификация с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов с помощью приборов Rotor-Gene 3000/6000 и Rotor-Gene Q

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q — программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000/для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q/ для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

Ж.1 Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включают прибор, запускают программу Rotor-Gene. Помещают подготовленные для проведения ОТ-ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения образцов в амплификаторе), устанавливают ротор в прибор, закрывают крышку. Программируют прибор.

Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (не пустой).

Нажимают кнопку *New/Новый* в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне *New Run/Новый тест* следует выбрать вкладку *Advanced/Детальный мастер.*

Во вкладке следует выбрать шаблон запуска эксперимента *TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл*, затем нажать кнопку *New/Новый*.

Выбирают тип ротора. Ставят отметку в окошке рядом с надписью *No Domed 0.2 ml Tubes Locking ring attached/0,2* см^3 *Кольцо закреплено.* Нажимают кнопку *Next/Далее.*

Выбирают объем реакционной смеси: *Reaction volume/Объем реакции — 0,025 см^3*. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко *0.015 ml oil layer volume/0,015* см^3 *объем масла/воска*. Нажимают кнопку *Next/ Далее*.

В верхней части окна нажимают кнопку *Edit profile/Редактор профиля*.

Задают параметры эксперимента (см. таблицу Ж.1).

Таблица Ж.1 — Программа амплификации BVDV

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/Удерж. темп-ры 1	50	30 мин	—	1
Hold 2/Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	—	1
Cycling 1/Циклирование 1	95	10 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	10 с	—	
Cycling 2/Циклирование 2	95	10 с	—	40
	55	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10	—	

Нажимают дважды кнопку *OK/Да*.

В нижней части окна следует нажать кнопку *Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.* В открывшемся окне нужно нажать кнопку *Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых*, затем выбрать функцию *Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-ом шаге детекции.* Для обоих каналов необходимо установить параметры *Min Reading/Миним. Сигнал — 5Fl* и *Max Reading/ Максим. Сигнал — 10Fl.* Окно следует закрыть, нажав кнопку *Close/Закрыть.*

Нажимают кнопку *Next/Далее*, запускают амплификацию кнопкой *Start run/Старт*.

Дают название эксперименту и сохраняют его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончанию его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку *Edit samples/Правка образцов* (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы и контроли следует обозначить как *Unknown/Образец*.

Ж.2 Анализ результатов

Ж.2.1 Анализ результатов по каналу FAM/Green

Нажимают в меню кнопку *Analysis/Анализ*, выбрают режим анализа *Quantitation/Количественный*, нажимают кнопку *Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать*.

Отменяют автоматический выбор *Threshold/Порог*.

В меню основного окна *Quantitation analysis/Количественный анализ* должны быть активированы кнопки *Dynamic tube/Динамич.фон* и *Slope Correct/Коррек. уклона*.

Выбирают линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку *Linear scale/Линейная шкала* в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки *Linear scale/Линейная шкала* видна кнопка *Log scale/Лог.шкала*).

В меню основного окна *More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов* следует установить значение *NTC threshold/Порог Фона — ПФ (NTC)* — 10 %.

В меню *CT Calculation/Вычисление CT* (в правой части окна) необходимо выставить *Threshold/Порог* = 0,05.

В таблице результатов (окно *Quant. Results/Количественные Результаты*) появятся значения *Ct*.

Ж.2.2 Анализ результатов по каналу JOE/Yellow

Анализ результатов по каналу JOE/Yellow необходимо провести аналогично анализу результатов по каналу FAM/Green в соответствии с настройками, указанными в таблице Ж.2.

Таблица Ж.2 — Анализ результатов по каналам FAM/Green и JOE/Yellow

Канал	Threshold/Порог	Dynamic tube/ Динамический фон	Slope Correct/ Коррекция уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	0,05	включена	включена	10 %
JOE/Yellow	0,1	включена	включена	10 %

Приложение И
(справочное)

Обратная транскрипция и амплификация с детекцией в режиме «реального времени», анализ результатов с помощью приборов iCycler iq5 и iCycler iq

И.1 Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Необходимо включить прибор и блок питания оптической части прибора, провести измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Следует открыть программу iCycler, задать схему планшета — расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:

Для прибора iCycler iQ5 в окне *Selected Plate Setup* модуля *Workshop* — нажать кнопку *Create New* или *Edit.* Редактировать схему планшета следует в режиме *Whole Plate loading.* В опции *Select and load Fluorophores* необходимо задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам *FAM, JOE*. Необходимо задать объем реакции *(Sample Volume)*: 0,025 $см^3$, тип крышек *(Seal Type): Domed Cap*, тип пробирок *(Vessel Type): Tubes*. Следует сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку *Save&Exit Plate Editing*.

Для прибора iCycler iQ в окне *Edit Plate Setup* модуля *Workshop*, в опции *Samples: Whole Plate Loading* следует задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждого образца в окне *Sample Identifier*. В опции *Select and load Fluorophores* следует задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам *FAM, JOE.* Необходимо сохранить схему планшета, задав имя файла в окне *Plate Setup Filename* (с расширением.*pts*) и нажав кнопку *Save this plate setup* (в верхней части экрана). Нужно назначить использование данной схемы планшета, нажав кнопку *Run with selected protocol*.

Необходимо задать программу амплификации (см. таблицу *И*.1).

Таблица И.1 — Программа амплификации BVDV

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	5
	60	25 с		
	72	25 с		
4	95	10	—	40
	55	25	FAM, JOE	
	72	25	—	

Для прибора iCycler iQ5 в окне *Selected Protocol* модуля *Workshop* необходимо нажать кнопку *Create New* или *Edit*, задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку *Save&Exit Protocol Editing*. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке *Protocol* (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке *Users*).

Для прибора iCycler iQ необходимо выбрать опцию *Edit Protocol*модуля *Workshop,* задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: *Cycle 3 — Step 2*. Следует сохранить протокол, задав имя файла в окне *Protocol Filename* (BVDV.tmo) и нажав кнопку *Save this protocol* (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке *View Protocol* в модуле *Library*. Выбрав или отредактировав нужную программу, следует назначить ее использование, нажав кнопку *Run with selected plate setup.* Нужно поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой, запустить выполнение выбранной программы BVDV с заданной схемой планшета.

Для прибора iCycler iQ5 перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола *(Selected Protocol*) и схемы планшета *(Selected Plate Setup)*. Для запуска следует нажать кнопку *Run*. Выбрать для измерения факторов лунок вариант *Collect Well Factors from Experimental Plate*. Необходимо нажать кнопку *Begin Run*, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать *OK*.

Для прибора iCycler iQ перед запуском выполнения программы в окне *Run Prep* следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Нужно выбрать для измерения факторов лунок вариант *Experimental Plate* в меню *Select well factor source*, задать объем реакционной смеси в окне *Sample Volume* — 0,025 $см^3$. Для запуска нужно нажать кнопку *Begin Run*, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимент) и нажать *OK*. После окончания программы следует приступить к анализу результатов.

И.2 Анализ результатов

Необходимо запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:
для прибора iCycler iQ5 следует выбрать нужный файл с данными анализа в окне *Data File* модуля *Workshop* и нажать кнопку *Analyze*;
для прибора iCycler iQ в модуле *Library* активировать окно *View Post-Run Data*. В окне *Data Files необходимо* выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку *Analyze Data*.

Далее следует провести анализ результатов по каналам FAM, JOE для каждого канала по отдельности, активируя кнопку с названием соответствующего флуорофора.

В режиме анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию) поочередно для каждого канала необходимо установить пороговую линию, двигая ее курсором при нажатой левой кнопке мыши, на уровне 5—10 % от максимального значения флуоресцентного сигнала образца К+. При этом пороговая линия должна пересекать только S-образные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем и не пересекать базовую линию.

Примечание — Чтобы выделить график образца «К+» (или другого желаемого образца) нужно установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

Далее следует вывести на экран таблицу результатов со значениями *Ct,* нажав кнопку *PCR Quant* (iCycler iQ) или кнопку *Results* (iCycler iQ5).

Приложение К
(справочное)

Обратная транскрипция и амплификация с детекцией в режиме «реального времени» и анализ результатов при помощи прибора CFX96

К.1 Проведение ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включают прибор и запускают программу Bio-Rad CFX Manager. В стартовом окне *Startup Wizard* необходимо выбрать позицию *Create a new Run/Experiment* (или в меню *File* выбрать *New* и далее *Run/ Experimen*), затем нажимают ОК.

В окне *Run Setup следует* выбрать вкладку *Protocol* и нажать кнопку *Create new*. В появившемся окне *Protocol Editor — New необходимо* задать параметры амплификации (см.таблицу К.1), затем задать объем реакционной смеси *Sample Volume* — 0,025 $см^3$.

Таблица К.1 — Программа амплификации BVDV

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	—	1
	95	15 мин	—	1
2	95	10 с	—	5
	60	25 с	—	
	72	25 с	—	
3	95	10 с	—	40
	55	25 с	FAM, HEX	
	72	25 с	—	

Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options*, следует задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate* 2,5 °C/sec, затем нажать *OK*.

Следует сохранить протокол: выбрать *File* и далее *Save As* в окне *Protocol Editor New*, ввести имя файла, нажать *Сохранить*.

Необходимо задать схему планшета. Во вкладке *Plate* — нажать кнопку *Create new*, в появившемся окне *Plate Editor — New* задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку *Select Fluorophores, необходимо* выбрать галочками в колонке *Selected* флуорофоры: FAM, HEX и нажать *OK*. В меню *Sample type следует* выбрать *Unknown* для всех образцов, затем задать галочками в колонке *Load* (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым каналам. В окне *Sample name следует* задать название образцов, при этом параметр *Load* должен быть отмечен галочкой.

Необходимо сохранить схему планшета: выбрать *File* и далее *Save As* в окне *Plate Editor New*, ввести имя файла, нажать *Сохранить*.

Нужно выбрать вкладку *Start Run.*, открыть крышку прибора, нажав кнопку *Open Lid.*, поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета, затем закрыть крышку прибора, нажав кнопку *Close Lid*.

Нужно следить за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не следует переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.

Нужно запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку *Start Run*, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать *Сохранить*.

К.2 Анализ результатов

Необходимо запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого следует выбрать в меню *File*, затем *Open* и *Data file* и выбрать необходимый файл.

В окне *Data Analysis* во вкладке *Quantification* представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

Для каждого канала нужно проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (*Threshold*) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положитель-

ных образцов и контролей на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем, и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить пороговую линию вручную на уровне 5 % — 10 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца К+ в последнем цикле амплификации, при том, что график флуоресценции К+ показывает характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Примечание — Чтобы выделить график образца «К+» (или другого желаемого образца), необходимо установить курсор в схеме планшета либо в таблице результатов.

Приложение Л
(справочное)

Интерпретация результатов с применением тест-системы «ВД» для выявления возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	кДНК ВКО-V	кДНК вируса диареи КРС

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данного образца РНК значения порогового цикла (Ct).

Результаты для контролей этапов экстракции и ОТ-ПЦР должны соответствовать критериям, указанным в таблице Л.1.

Таблица Л.1 — Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция РНК	≤30	отсутствует
$К^-$	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
$К^+$	ОТ-ПЦР	≤30	≤30

Дальнейший учет результатов реакции проводится только при корректных значениях контрольных образцов. При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна.

Принцип интерпретации результатов для исследуемых образцов показан в таблице Л.2.

Таблица Л.2 — Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
≤33	отсутствует	РНК вируса диареи КРС НЕ обнаружена
Определено или отсутствует	≤37	РНК вируса диареи КРС обнаружена
отсутствует или > 33	отсутствует или > 37	Невалидный*
≤33	>37	Сомнительный**

* В случае получения невалидного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции РНК.

** В случае получения сомнительного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена РНК вируса диареи КРС.

Библиография

[1] МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности

[2] СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

УДК 619:616.9:006.354 ОКС 11.220

Ключевые слова: вирусная диарея, крупный рогатый скот, лабораторная диагностика, серологические реакции, полимеразная цепная реакция, реакция нейтрализации, культура клеток, реакция иммунофлуоресценции

Редактор *Н.А. Аргунова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 12.11.2025. Подписано в печать 19.11.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,12. Уч.-изд. л. 4,65.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru