МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Вирусологическое исследование отдельных экземпляров иксодовых клещей с использованием методов микроанализа

МОСКВА 1986

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Вирусологическое исследование отдельных экземпляров иксодовых клещей с использованием методов микроанализа

МОСКВА 1986

Методические рекомендации разработаны:

Омский НИИ природноочаговых инфекций МЗ РСФСР (Л. С. Субботина, О. В. Наволокин, П. Г. Мансуров, В. С. Кокорев, Н. А. Пеньевская, И. И. Богданов)

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР (С. Я. Гайдамович, Н. А. Лаврова)

Рекомендации предназначены для врачей-вирусологов, паразитологов, эпидемиологов СЭС, а также лабораторий НИИ, занимающихся изучением арбовирусов.

«УТВЕРЖДАЮ»

И. о. начальника Главного санитарно-эпидемиологического Управления Минздрава СССР
11 августа 1986 г.

Заиченко А. И.

ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ЭКЗЕМПЛЯРОВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МИКРОАНАЛИЗА

ВВЕДЕНИЕ

Традиционным в вирусологической практике при изучении вирусофорности эпидемически значимых переносчиков клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций являлось исследование пулов, состоящих из 10 и более клещей, этот же принцип используется при выделении штаммов вирусов. В методических рекомендациях излагается подробная методика исследования отдельных экземпляров иксодовых клещей для определения их вирусофорности с использованием иммуноферментного метода для прямого обнаружения вируса клещевого энцефалита в исследуемом материале и комбинированное применение микрокультуры клеток и иммуноферментного метода для накопления и индикации вируса в пробах, где его содержание очень низкое.

Вирусологическое исследование отдельных экземпляров клещей является целесообразным, т. к. позволяет получить прямые сведения не только о проценте инфицированных клещей на обследуемых территориях, но и количественно охарактеризовать содержание вируса. Выделение штаммов вируса с целью изучения их биологических свойств из отдельных экземпляров клещей исключает возможность генотипического и фенотипического смешения в процессе выделения, что не исключено при выделении вируса из пула клещей. Исследование отдельных экземпляров клещей при их присасывании на людях с целью определения их возможной инфицированности является важным моментом для проведения своевременной и целенаправленной пассивной иммунизации.

Преимущества ИФМ состоят в возможности прямого определения вирусного антигена в минимальных объемах исследуемого материала, простоте выполнения, высокой чувствительности и специфичности. В случае необходимости ИФМ можно дополнить методами биологического накопления вируса. Если вирус в пробе присутствует в количествах, не выявляемых с помощью ИФМ, его следует размножить в микрокультуре до уровня, превышающего порог чувствительности в ИФМ. Комплексное использование ИФМ и метода микрокультуры клеток дает возможность определить титр инфекционного вируса в отдельных экземплярах клещей, а также провести его накопление в количествах, достаточных для изучения биологических свойств. К основным достоинствам метода микрокультуры клеток, по сравнению с другими методами выделения вируса с использованием биологических моделей, следует отнести высокую экономичность и возможность проведения массового исследования проб с минимальными трудозатратами и высокой эффективностью.

Методические рекомендации предназначены для врачей-вирусологов, эпидемиологов, паразитологов санэпидстанций, лабораторий научно-исследовательских институтов, занимающихся вопросами изучения вируса клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекций.

1. Применяемые в тексте сокращения

ИФМ — иммуноферментный метод.
ФЭК — фибробласты эмбрионов кур (первичная культура).
СПЭВ — культура клеток почек эмбриона свиньи (перевиваемая).
КББ — карбонатно-бикарбонатный буфер
ФСБ — фосфатно-солевой буфер
ФСБ-С — фосфатно-солевой буфер с сорбиталем.
ФСБ-СС — фосфатно-солевой буфер с сорбиталем и сывороткой
ОФД — ортофенилендиамин.

2. Лабораторное оборудование, реактивы, материалы

2.1. Спецификация оборудования

Планшеты для иммунологических реакций с плоским дном из полистирола, ТУ 64-2-278-79.

Пробирки для микропроб объемом 0,5 и 1,5 $см^3$ Ленинградского завода медицинских полимеров.

Дозаторы пипеточные, ПЛ-01.

Центрифуга лабораторная типа ЦЛО-3.

pH-метр любой марки.

Холодильник бытовой и на —40° любой марки.

Термостаты на 37° и с углекислым газом.

Весы торсионные ВТ-500.

Шприц непрерывного действия типа рекорд.

Насос водоструйный НВ.

Микроскоп 50—100^{x} любой марки.

Осветитель ртутно-кварцевый ОКР-21.

Фотометр или спектрофотометр на 492 нм.

Лабораторная стеклянная посуда: пробирки, пипетки градуированные и пастеровские, чашки Петри, колбы, цилиндры мерные.

2.2. Реактивы

Азот жидкий.

Альбумин бычий сывороточный, сухой, ТУ 10П-34-62.

Вода дистиллированная и бидистиллированная, требования ГФ-X, стр. 107.

Калий двухромовокислый ($K_2Cr_2O_7$), хч, ГОСТ 4220-75.

Лимонная кислота ($C_6H_7O_8$), хч, ГОСТ 3652-75.

Натрий углекислый (Na_2CO_3), хч, ГОСТ 8379.

Натрий двууглекислый ($NaHCO_3$), хч, ГОСТ 4201-79.

Натрий гидроокись (NaOH), хч, ГОСТ 4328-77.

Натрий хлористый (NaCl) хч, 4233-77.

Натрий фосфат однозамещенный ($NaH_2PO^4 \times 2H^2O$), чда, ГОСТ 245-76.

Натрий фосфат двузамещенный (Na_2HPO_4, чда, ГОСТ 11773-76.

Орто-фенилендиамин — $C_2H_4(NH_2)_2$ МРТУ 095880-694.

Перекись водорода (H_2O_2) 30%, хч, ГОСТ 10929-76.

Пенициллин-натриевая или калиевая соль.

Раствор Хэнкса.

Раствор полиглюкина (Красноярский завод медицинских препаратов).

Спирт этиловый.

Среда 199×10 (десятикратный концентрат).

Сорбиталь С-20, ГОСТ 01105. 113-63.

Телячья сыворотка (производство НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва).

Стрептомицина сульфат.

Кислота серная (H_2SO_4) хч, ГОСТ 4204-77.

HEPES (N) 2-гидроксиэтил (пиперазин = N-2 = этансульфоновая кислота) , Serva, ФРГ, 25245.

2.3. Материалы

Иммуноглобулин к вирусу клещевого энцефалита*.

Антиген нормальный (контрольный)*.

Антиген вируса клещевого энцефалита**.

Диагностикум вируса клещевого энцефалита пероксидазный*.

3. Подготовка клещей для исследования

Членистоногих перед исследованием сортируют по половым и возрастным признакам. Клещей промывают 1 раз в этиловом спирте и 2—3 раза в растворе Хэнкса, pH 7,2—7,4 с антибиотиками (пенициллина 500 ед/мл и стрептомицина 1000 ед/мл). Каждого клеща переносят в небольшую охлажденную фарфоровую ступку и растирают. Для приготовления суспензии клеща добавляют 0,2 мл раствора Хэнкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 100—200 ед/мл) и 1% бычьего сывороточного альбумина.

Наиболее удобно растирать отдельные экземпляры клещей в пластмассовых пробирках для микропроб. Клеща переносят пинцетом в пробирку и опускают ее в жидкий азот на 10—15 секунд, гомогенизируют пестиком из нержавеющей стали (стержень диаметром 3—4 мм с краями, закругленными по внутренней форме пробирки). В пробирку добавляют 0,2 мл раствора Хэнкса с антибиотиками и альбумином. Пестик после использования прожигается над пламенем горелки, охлаждается в жидком азоте и используется повторно. Применение жидкого азота для глубокого замораживания клещей дает возможность сохранить биологическую активность материала и способствует более тонкому измельчению тканей клеща.

---

* — готовится к выпуску Томским НИИВС

** — выпускается Томским НИИВС

Из приготовленных суспензий берут 0,05 мл для исследования ИФМ и по 0,02 мл переносят на культуру клеток (в лунки панели). Оставшийся материал хранят при —40° С или при —70° в холодильнике или в жидком азоте для повторного исследования и для реизоляции вируса. Хранить не более года.

4. Ход исследования

4.1. Иммуноферментный метод

Для прямой индикации вируса клещевого энцефалита ИФМ используют суспензии индивидуальных клещей. При предварительном выделении вируса в культуре клеток, для исследования ИФМ используется культуральная жидкость. Суспензии клещей и культуральные сливы перед исследованием осветляют центрифугированием при 2000 об/мин. в течение 10 минут.

4.1.1. Сенсибилизация планшетов

Специфический иммуноглобулин против вируса клещевого энцефалита, разведенный в КББ с pH 9,6 до концентрации 100 мкг/мл, вносят по 0,1 мл в каждую лунку планшета. Планшет оставляют в термостате при 37° С на 2 часа во влажной камере.

Неадсорбировавшиеся иммуноглобулины удаляют вытряхиванием, лунки дважды промывают 0,01М ФСБ с pH 7,4. После промывки планшеты подсушивают постукиванием по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

Готовят 1% раствор бычьего сывороточного альбумина на 0,01М ФСБ, вносят его в каждую лунку планшета, заполняя ее до края и оставляют на 1 час при 37° С. Альбумин адсорбируется на поверхности лунок, не занятой специфическим иммуноглобулином, предотвращая неспецифическую адсорбцию белков исследуемого материала.

Альбумин удаляют вытряхиванием и подсушивают постукиванием по фильтровальной бумаге. Сенсибилизированные планшеты можно сохранять в полиэтиленовых пакетах при 4°С в течение 3 —4 недель.

4.1.2. Постановка метода

Разведения исследуемого материала делают на ФСБ-С (ФСБ с 0,05% сорбиталя) с 1% альбумина или 10% телячьей

сыворотки (ФСБ-С). В лунки планшетов вносят по 0,05 мл каждого разведения. Инкубируют 1 час при 37° С или 18 часов при 4°С. На каждом планшете должны присутствовать стандартный специфический антиген вируса клещевого энцефалита и нормальный антиген (отрицательный контроль).

Содержимое лунок удаляют вытряхиванием в дезраствор, трижды промывают как описано в п. 1.1., подсушивают постукиванием по фильтровальной бумаге.

Рабочее разведение пероксидазного диагностикума (указано на этикетке) готовят на ФСБ-С с 2% альбумина или 50% телячьей сыворотки. Диагностикум вносят по 0,1 мл в каждую лунку и оставляют для инкубации на 1 час при 37°С.

Планшет вытряхивают, промывают, подсушивают (п. 1.1.).

Готовят субстрат-индикаторный раствор и сразу же вносят во все лунки планшета по 0,1 мл, оставляют в темноте при комнатной температуре на 15—20 минут. Реакцию можно считать законченной, если в лунках со специфическим стандартным антигеном есть четкое желто-коричневое окрашивание субстрата, а лунки с нормальным антигеном остаются неокрашенными. Реакцию останавливают добавлением в каждую лунку 0,1 мл 2Н раствора серной кислоты.

Учет реакции визуальный или с помощью фотометра при длине волны 492 нм.

4.1.3. Учет и интерпретация результатов

При визуальном учете результат считают положительным, если в лунках появляется отчетливое желто-коричневое окрашивание различной интенсивности. При этом необходимо учитывать результаты реакции в контрольных лунках: контрольный специфический антиген выявляется желто-коричневым окрашиванием субстрат-индикаторного раствора, тогда как в лунках с нормальным антигеном окрашивания быть не должно.

Для количественной оценки содержания антигена в положительных пробах при визуальном учете результатов используют разведения антигенов. Количество антигена оценивают его титром — максимальным разведением антигена, в котором еще можно наблюдать различимое глазом окрашивание субстрат-индикаторного раствора.

При инструментальном учете результатов реакции на фотометре при длине волны 492 нм содержимое лунок перено-

сят в микрокювету и измеряют оптическую плотность пробы. Результат оценивают, как положительный, если отношение оптической плотности исследуемой пробы к оптической плотности стандартного нормального антигена составляет не менее 2,1.

4.2. Вирусологическое исследование отдельных экземпляров клещей на культуре клеток

В качестве чувствительной системы для биологического накопления вируса используют первично-трипсинизированные клетки фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) или клетки перевиваемой линии СПЭВ, выращенные в лунках планшетов для иммунологических реакций (микрокультура клеток).

4.2.1. Посадка клеток на планшеты

Приготовленную суспензию клеток* разводят средой роста** до концентрации 300—400 тыс. кл/мл для перевиваемых клеток СПЭВ и 5—6 млн кл/мл для первичных ФЭК, разливают шприцем-дозатором по 0,2 мл в каждую лунку планшета. После заполнения планшеты закрывают крышками и помещают в термостат 37°С. Монослой формируется через 12—18 часов.

4.2.2. Заражение культур клеток исследуемым материалом

Сформированный монослой контролируют визуально или под луной х4—8, среду отсасывают водоструйным насосом в любую подходящую емкость через тонкую иглу для инъекций. Для предотвращения повреждения монослоя клеток кончик иглы погружают вдоль стенки лунки. После отсасывания среды качество монослоя дополнительно контролируют под микроскопом — монослой должен быть плотным, без просветов. Далее в лунки вносят по 0,2 мл раствора Хэнкса. Через 5—7 минут раствор отсасывают и отмывают монослой еще раз. После этого в лунки вносят по 0,18 мл среды поддержания**.

---

* — используют любую из опубликованных методик приготовления суспензий первичных и перевиваемых клеток (см., например, «лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний» под ред. Э. Леннета и Н. Шмидт, М., Медицина, 1974)

** — см. Приложение

Для выделения вируса первичный материал исследуют без разведения, внося по 0,02 мл суспензии каждого клеща в 2—4 лунки планшета. Планшеты накрывают крышками и помещают в термостат 37°С. Через 72 часа культуральную жидкость исследуют ИФМ.

При определении титра вируса клещевого энцефалита материал исследуют в разведениях с 10^{-1} до 10^{-5}. 10-кратные разведения исследуемого материала готовят непосредственно в лунках с клетками. На каждое разведение выделяют по 4 лунки. В лунки первого разведения вносят по 0,02 мл суспензии клеща пипеточным дозатором. Наконечник дозатора меняют, содержимое лунки осторожно, чтобы не повредить монослой клеток, пипетируют и переносят по 0,02 мл в лунки следующего разведения и т. д. После приготовления разведений планшеты закрывают крышками и помещают в термостат 37°С. Через 72 часа культуральную жидкость из лунок планшетов переносят в соответствующие лунки свежеприготовленной культуры клеток (для этого за 18 часов заливают суспензией клеток необходимое количество планшетов) по 0,05 мл, после чего в каждую лунку добавляют по 0,15 мл среды поддержания. Через 72 часа культуральную жидкость исследуют ИФМ. За титр вируса принимают то конечное разведение, при заражении которым в 50% и более лунок с клетками после накопления обнаруживается вирусспецифический антиген ИФМ. Титр вычисляют методом Рида и Менча.

5. Тактика проведения вирусологического исследования отдельных экземпляров иксодовых клещей с использованием ИФМ и микрокультуры клеток

5.1. Определение вирусофорности клещей в документированных очагах клещевого энцефалита

При ежегодном контроле вирусофорности эпидемиологически значимых переносчиков в документированных очагах клещевого энцефалита для выявления колебаний инфицированности клещей достаточно применения только ИФМ. Антиген вируса клещевого энцефалита определяют в 150—170 клещах скринингом суспензий клещей и рассчитывают вирусофорность. При необходимости количественной оценки содержания вируса в клещах положительные пробы исследуют в разведениях (с коэффициентом 2) ИФМ для определения титра вируса.

5.2. Определение вирусофорности клещей в неизвестных (предполагаемых) очагах клещевого энцефалита

Основной задачей при исследовании клещей, собранных на неизученных территориях, является определение их вирусофорности с использованием максимально чувствительной тест-системы. В этом случае исследование первичного материала ИФМ является предварительным и служит для получения экспресс-информации о присутствии вируса в клещах на данной территории. Окончательный результат об инфицированности клещей можно получить после дополнительного вирусологического исследования отрицательных в ИФМ проб в микрокультуре клеток с последующей индикацией вируса клещевого энцефалита. Для этого через 72 часа после инокуляции первичного материала на монослой клеток культуральные сливы исследуют ИФМ.

5.3. Проведение количественных вирусологических исследований с определением титра вируса клещевого энцефалита в отдельных экземплярах клещей

При сравнительной оценке лоймопотенциала однотипных очагов важной характеристикой является не только процент инфицированности клещей, но и количество (титр) вируса клещевого энцефалита, содержащегося в отдельных экземплярах иксодовых клещей. Для получения экспресс-информации клещей исследуют ИФМ (см. п. 5.1.). Выделение инфекционного вируса и определение титра проводят в микрокультуре клеток (см. п. 4.2.2.).

5.4. Выделение штаммов вируса клещевого энцефалита из отдельных экземпляров клещей для дальнейшего изучения их биологических свойств

Суспензии индивидуальных клещей исследуют ИФМ. Пробы, в которых обнаружен антиген вируса клещевого энцефалита, используют для заражения микрокультуры клеток. На каждую пробу берут 4 лунки с монослоем клеток (по 0,02 мл суспензии клещей в каждую лунку). Через 72 часа содержимое лунок переносят в отдельную для каждой пробы пробирку, исследуют ИФМ для контроля накопления вируса. Полученный на культуре клеток вируссодержащий материал можно использовать для заражения белых мышей

или пробирочных клеточных культур для накопления вируса в большем объеме материала с целью дальнейшего изучения биологических свойств. Исследования проводят в условиях, исключающих возможность контаминации материала другими вирусами. Поскольку каждого клеща исследовали дважды ИФМ: до и после накопления вируса в микрокультуре клеток, реизоляция вируса из первичного материала не обязательна.

5.5. Вирусологическое исследование клещей, присосавшихся к человеку

При необходимости исследования клещей, снятых после присасывания к людям, основной задачей является получение достоверного результата о наличии вируса в клеще в максимально короткие сроки. Для этого суспензию каждого клеща исследуют ИФМ и одновременно инокулируют в микрокультуру клеток. Обнаружение антигена вируса клещевого энцефалита ИФМ возможно (при наличии заранее сенсибилизированных планшетов) через 2,5—3 часа. Положительный результат ИФМ является достаточным основанием для проведения экстренной специфической профилактики. Окончательный результат получают при исследовании ИФМ культуральной жидкости, собранной через 72 часа после заражения микрокультуры клеток суспензией клеща.

6. Приложение

6.1. Методика сбора клещей для оценки их вирусофорности

Тактика обследования природных очагов инфекции строится в зависимости от задач, стоящих перед исследователем. При разведке территории на наличие очагов клещевого энцефалита необходимо получить данные о вирусофорности клещей за минимальный срок с наибольшего количества участков. С этой целью территорию, подлежащую обследованию, разбивают на ряд участков, лежащих в различных природных зонах (подзонах), различающихся по геоботанической характеристике. На каждом участке определяют 3—5 маршрутов протяженностью не менее 3 км каждый, с расстояниями между ними 5—10 км. В случае низкой численности клещей, если на всех маршрутах в сумме не удается собрать необходимое количество клещей (150—170 экземпляров), закладывают по такой же схеме дополнительные маршруты.

При высокой численности клещей, когда на минимальном количестве маршрутов (три) собирают клещей больше необходимого минимума и нет возможности исследовать их всех, из общего количества произвольно выбирают необходимое число (после смешивания всех сборов). Такая тактика применяется тогда, когда наблюдения ведутся на однородной территории (тайга, крупный островной лесной массив). При работе на мозаичной территории (мелкие островные леса, колки лесостепи) один маршрут, как правило, пролагается на территории одного такого небольшого леса. В этом случае, поскольку промежуточная территория обычно не приспособлена для существования очагов (зачастую окультурена), расстояния между лесными участками могут быть и меньше, чем в первом случае.

При изучении многолетней динамики вирусофорности клещей на участках, где известно постоянное существование очагов, закладываются учетные площадки в различных типах ландшафтов с таким расчетом, чтобы на каждой площадке можно было провести 9—12 км учетных маршрутов, которые должны равномерно охватывать всю территорию площадки.

6.2. Приготовление рабочих растворов

6.2.1. Карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ) pH 9,6

1,59 г Na_2CO_3 и 2,93 г $NaHCO_3$ растворить в 1 л дистиллированной воды. Буфер хранят при 4°С в течение 6 месяцев.

6.2.2. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) 0,01М pH 7,4

Приготовить: раствор А — 0,1М Na_2HPO_4 — 14,2 г растворить в 1 л дистиллированной воды,

раствор Б—0,1М $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ — 7,8 г растворить в 0,5 л дистиллированной воды.

Приготовить 0,1М ФСБ: соединить 810 мл раствора А и 190 мл раствора Б. Проверить pH и, если необходимо, довести до 7,2—7,4 добавлением раствора А, если pH надо сдвинуть в щелочную сторону или раствора Б, если pH надо сдвинуть в кислую сторону. Раствор хранят при 4°С в течение 6 месяцев.

Непосредственно перед использованием готовят 0,01М ФСБ: во флакон объемом 1 л насыпают навеску 8,5 г хлористого натрия, добавляют 900 мл дистиллированной воды и 100 мл 0,1М ФСБ.

6.2.3. Фосфатно-цитратный буфер, pH 5,0

Приготовить: раствор А — 0,2М Na_2HPO_4 — 5,68 г растворить в 200 мл дистиллированной воды;
раствор Б — 0,1М раствор лимонной кислоты — 4,2 г — растворить в 200 мл дистиллированной воды; 98,6 мл раствора А соединить с 101,4 мл раствора Б. Довести pH до 5,0 одним из компонентов. Буфер хранят при 4°С не более недели!

6.2.4. Субстрат-индикаторный раствор

Непосредственно перед использованием 50 г ортофенилендиамина (ОФД) растворить в 100 мл фосфатно-цитратного буфера, добавить 0,4 мл 3% раствора перекиси водорода. Приготовленный раствор необходимо использовать немедленно. Хранению не подлежит!

6.2.5. Раствор серной кислоты 2-нормальный

4,9 мл концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,85 г/см^3) добавить в 95 мл дистиллированной воды (кислоту наливать в воду, а не наоборот!). Хранят при комнатной темтературе. Срок хранения не ограничен.

6.2.6. Приготовление хромовой смеси

300 г $K_2Cr_2O_7$ растворить в 200 мл дистиллированной воды при кипячении (10—15 мин.) и осторожно залить 5 литрами концентрированной серной кислоты.

6.2.7. Приготовление 100-кратного концентрата буферного раствора HEPES с антибиотиками

Буфер HEPES добавляют в культуральную среду для стабилизации pH при выращивании микрокультуры клеток в лунках планшетов для иммунологических реакций в условиях обычного термостата. При использовании термостата с углекислым газом применение этого буфера не обязательно.

47,6 г буфера HEPES растворить в 200 мл бидистиллированной воды и довести pH до 8,1 10М раствором NaOH (40 г на 100 мл дистиллированной воды). Раствор стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца или мембранный

фильтр с диаметром пор 250—350 нм («Владипор» № 3) и разливают в пробирки по 1 мл. Стерилизацию фильтрованием можно заменить обработкой антибиотиками, добавляя сухой пенициллин и стрептомицин до конечной концентрации 100000 ед/мл каждого и выдерживая 30 минут при 37°С. Хранить при 4°С. Срок хранения не ограничен.

6.2.8. Среда роста

10 мл 10-кратного концентрата среды 199 развести стерильной бидистиллированной водой до 84 мл, добавить 15 мл телячьей сыворотки и (если используют обычный термостат) 1 мл 100-кратного концентрата HEPES с антибиотиками.

6.2.9. Среда поддержания

10 мл 10-кратного концентрата среды 199 развести бидистиллированной водой до 89 мл, добавить 10 мл раствора полиглюкина и (если используют обычный термостат) 1 мл 100-кратного концентрата HEPES с антибиотиками.

6.3. Подготовка и стерилизация планшетов для микрокультуры клеток

Планшеты выдерживают в хромовой смеси 1,5—2 часа, отмывают 30 раз под струей водопроводной воды (с обеих сторон), прополаскивают в 5 сменах дистиллированной воды и погружают в этиловый медицинский спирт 96% на 10—15 минут. Планшеты и крышки стерилизуют излучением ртутно-кварцевой лампы (мощность 1 кВт) на расстоянии 30 см в течение 1,5 часов. Планшеты можно использовать многократно.

6.4. Противоэпидемический режим

Постановка метода и работа с инфекционным материалом проводится в строгом соответствии с «Правилами устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лаборатории (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР», утв. МЗ СССР 20.10.81 г., № 2455.

gost.e-ecolog.ru

Л 57296. Ом. обл. тип. 1986 г. З. 6488, т. 500