4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Контроль сыворотки крови крупного рогатого скота на присутствие посторонних вирусов и микоплазм

Методические указания
МУК 4.2.2123—06

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: ФГУН «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича» Роспотребнадзора (Н. В. Шалунова, З. Е. Бердникова, Е. М. Петручук).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 2 от 11.07.06).

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 17 августа 2006 г.

4. Введены взамен: РД 42-28-14—88 «Контроль сыворотки крови крупного рогатого скота на отсутствие вирусов-контаминантов и микоплазм» .

Содержание

1. Область применения . . . 108
2. Общие положения . . . 108
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, оборудование, реактивы, материалы . . . 109
4. Требования безопасности . . . 110
5. Условия проведения контроля . . . 110
6. Контроль сыворотки на присутствие посторонних вирусов . . . 111
   6.1. Подготовка к выполнению контроля . . . 111
   6.2. Культивирование и подготовка перевиваемой клеточной культуры почки быка (МДВК) . . . 112
   6.3. Выполнение контроля сыворотки на присутствие посторонних вирусов . . . 113
   6.4. Учет результатов . . . 114
7. Контроль сыворотки на присутствие микоплазм . . . 114
   7.1. Микробиологический метод контроля сыворотки на присутствие микоплазм 114
   7.2. Чувствительность микробиологического метода . . . 114
   7.3. Приготовление бульонной среды . . . 114
   7.4. Стерильность питательной среды . . . 115
   7.5. Определение ростовых свойств среды, содержащей 0,3 % агара . . . 115
   7.6. Подготовка сред для контроля . . . 115
   7.7. Выполнение контроля сыворотки на присутствие микоплазм микробиологическим методом . . . 115
   7.8. Учет результатов . . . 115
8. Контроль сыворотки на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры (цитохимический метод) . . . 116
   8.1. Подготовка к выполнению контроля на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры . . . 116
   8.2. Выполнение контроля сыворотки на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры . . . 117
   8.3. Учет результатов . . . 117
   Приложение . . . 118

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
17 августа 2006 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Контроль сыворотки крови крупного рогатого скота на присутствие посторонних вирусов и микоплазм

Методические указания
МУК 4.2.2123—06

1. Область применения

1.1. Методические указания устанавливают методы контроля коммерческой сыворотки крови крупного рогатого скота (далее – *сыворотка*) на присутствие посторонних вирусов и микоплазм. Сыворотка широко применяется при культивировании органов и тканей животных, используемых для приготовления профилактических и диагностических иммунобиологических препаратов и в научных исследованиях. Сыворотка является одним из компонентов питательных сред, используемых для культивирования первичных и перевиваемых клеточных культур.

1.2. Методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, выпускающих и контролирующих медицинские иммунобиологические профилактические препараты.

1.3. Методические указания также могут использоваться организациями, зарегистрированными в Российской Федерации, выпускающими и контролирующими медицинские иммунобиологические профилактические препараты, и специалистами научных лабораторий.

2. Общие положения

Контроль сыворотки на присутствие посторонних вирусов предусматривает использование первично-трипсинизированных и перевиваемых клеточных культур, являющихся высокочувствительными и доступными для выявления наиболее часто встречающихся вирусов-контаминантов. В этих культурах хорошо размножаются с развитием цитопатических изменений вирусы парагриппа, инфекционного ринотрахеита, диареи и аденовирусы. Продолжительность контроля 28 сут.

Контроль сыворотки на присутствие микоплазм предусматривает проведение двух методов:

1. Микробиологический метод. Метод основан на выявлении роста микоплазм при внесении испытуемой сыворотки в питательные среды. Продолжительность контроля 21 сут.

2. Метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический метод).

Метод основан на выявлении ДНК микоплазм, окрашенных флюорохромом Hoechst – 33258 на индикаторной клеточной культуре Vero.

Продолжительность контроля 3—5 сут.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, оборудование, реактивы и материалы

3.1. При выполнении контроля должны быть применены следующие средства измерений, оборудование и вспомогательные устройства:

весы аптечные от 1 до 20 г, погрешность ± 20 мг	ТУ 64-1-2834—80
колбы стеклянные, конические, вместимостью 50 мл, 100 мл	ГОСТ 25336—82Е
стакан химический вместимостью 1 000 мл	ГОСТ 25336—82Е
пипетки градуированные от 1,0 до 10,0 мл	ГОСТ 29227—91
пробирки бактериологические вместимостью от 10,0 до 20,0 мл	ГОСТ 25336—82Е
стакан химический, вместимостью 1 000 мл	ГОСТ 25336—82Е
флаконы для культивирования из нейтрального стекла (матрасы)	ГОСТ 5636—70
флаконы, вместимостью 100, 500 мл	МРТУ 5031—32
мешалка магнитная	МРТУ 64-1-1503—67
микроскоп биологический (любой модели)	
микроскоп люминесцентный серии ЛЮМАМ	
ножницы медицинские	ГОСТ 21239—93
пинцеты анатомические	ТУ 64-1-37—78
пробки резиновые	ТУ 38.006269—95
стекла предметные	ТУ 9464-001-33016370—95
чашки Петри (однократного применения)	ТУ 64-2-19—79
воронка стеклянная	ГОСТ 25336—82Е
камера Горяева	ТУ 9443-001-11856833—94
термостат на температуру 37 °С с погрешностью измерения не более ± 1 °С	
холодильник с температурой от 4 до 10 °С вместимостью 1 000 мл	
холодильник с температурой минус (20 ± 4) °С	

центрифуга ЦЛС-3	МРТУ 42.1778—65 (495)

3.2. При выполнении контроля должны быть применены следующие реактивы и материалы:

бензилпенициллина натриевая соль	ФСП 42-0048-1083—01
стрептомицина сульфат	ФС 42-3726—99
версена раствор	ФСП 42-0196-3274—02
вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
гидролизат сердца крупного рогатого скота	
дрожжи хлебопекарные прессованные	ГОСТ 171—81
глицерин, чда	ГОСТ 6259—75
масло иммерсионное кедровое (чистое)	ТУ 81-05-79—75
мясная вода	ТУ 42.14.271—82
натрия гидроокись	ГОСТ 4228—77
натрия хлорид	ГОСТ 4233—77
раствор Хенкса	ФСП 42-0343-3541—02
спирт этиловый ректификованный 96°	ГОСТ 18300—87
питательная среда ДМЕМ	ФСП 42-0343-3544—02
сыворотка крови крупного рогатого скота, жидкая для культур клеток (предварительно отконтролированная на присутствие посторонних вирусов и микоплазм)	ФСП 42-0196-4672—03
тестикулы эмбрионов быка (получают на мясокомбинате, срок хранения не более 1 сут. при температуре от 4 до 10 °С)	
трипсин (0,25 %-й раствор)	ФСП 42-0343-3805—03
хлороформ	ГОСТ 20015—88
бумага фильтровальная	ГОСТ 12026—761
вата медицинская гигроскопическая	ТУ 8195-01116673801—99
марля медицинская	ГОСТ 9412—93, ТУ 9390-0119-34576906—95.

4. Требования безопасности

Работу с микроорганизмами 3 и 4 групп проводят в соответствии с СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

5. Условия проведения контроля

Подготовительные операции и испытания на присутствие посторонних вирусов и микоплазм проводят в чистых помещениях класса А / В (GMP) с ламинарным

потоком воздуха при соблюдении правил асептики, при температуре (20 ± 2) °С и относительной влажности 60—70 %.

6. Контроль сыворотки на присутствие посторонних вирусов

При выполнении контроля используют два вида клеточных культур: первично-трипсинизированные–тестикулы эмбрионов быка (ТБ) 4—6-месячного возраста и перевиваемые – почки быка (МДВК) или любые другие перевиваемые клеточные культуры почки крупного рогатого скота, в которые вносят исследуемые сыворотки. Принцип метода основан на появлении цитопатического действия (ЦПД) или гемадсорбции под действием вирусов-контаминантов.

6.1. Подготовка к выполнению контроля

При подготовке к выполнению контроля сыворотки на присутствие посторонних вирусов должны быть выполнены следующие операции:

6.1.1. Приготовление первично-трипсинизированной клеточной культуры тестикулов эмбрионов быка (ТБ).

6.1.2. Доставляют тестикулы эмбрионов быков 4—6-месячного возраста с перевязанной мошонкой с мясокомбината в любом стерильном сосуде с 250—270 мл раствора Хенкса с 500 ед/мл бензилпенициллина калиевой или натриевой соли.

6.1.3. Обжигают кожу мошонки над пламенем горелки и обрабатывают тампоном со спиртом.

6.1.4. Срезают ножницами кожу с кончика мошонки и, подтягивая тестикулы за семенные канатики, извлекают их.

6.1.5. Помещают тестикулы в стерильную чашку Петри и удаляют ножницами белочную оболочку.

6.1.6. Переносят тестикулы в чашку Петри с 30—35 мл раствора Хенкса с 100 ед/мл антибиотика.

6.1.7. Разрезают тестикулы вдоль и вылущивают ножницами содержимое в раствор Хенкса.

6.1.8. Промывают ткань тестикулов до просветления жидкости 2—3 раза в растворе Хенкса с 500 ед/мл антибиотика.

6.1.9. Помещают ткань тестикулов в колбу вместимостью 500 мл с перемешивающим стержнем, прилагаемым к магнитной мешалке.

6.1.10. Нагревают 0,2 %-й раствор трипсина до температуры (20 ± 2) °С и наливают 100—150 мл в колбу. Колбу ставят на магнитную мешалку и включают ее. Скорость вращения перемешивающего стержня должна быть такой, чтобы жидкость не пенилась и стержень не ударялся о стенки колбы.

Перемешивание проводят 5—6 мин.

6.1.11. Сливают надосадочную жидкость после первого цикла трипсинизации в колбу для отходов.

6.1.12. Проводят 4—5 циклов трипсинизации.

6.1.13. Сливают надосадочную жидкость после каждого цикла во флаконы вместимостью 100 мл.

6.1.14. Помещают флаконы в центрифугу и осаждают клетки при скорости 1 000—1 500 об/мин в течение 10—15 мин.

6.1.15. Вынимают флаконы из центрифуги, сливают надосадочную жидкость в сосуд для отходов.

6.1.16. Добавляют в каждый флакон к осадку клеток по 10—15 мл среды 0,5 %-го гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса.

6.1.17. Объединяют полученные суспензии клеток в один флакон и отбирают пипеткой (0,5 ± 0,01) мл.

6.1.18. Добавляют к 0,5 мл этой суспензии 0,5 мл 0,1 %-го раствора метиленового синего и подсчитывают окрашенные клетки в камере Горяева при увеличении $70^{\times}$. Для точности результатов подсчет проводят в нескольких пробах. Количество клеток в 1 мл подсчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \times 1000 \times 2}{0{,}9}, \quad \text{где}$$

X – концентрация клеток в 1 мл исходной суспензии;
a – среднее число клеток в нескольких пробах;
0,9 – объем камеры Горяева в $мм^3$;
1000 – число $мм^3$ в 1 $см^3$;
2 – коэффициент разведения суспензии добавленным объемом краски.

6.1.19. Разводят суспензию клеток средой ДМЕМ во флаконе по п. 6.1.17 с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось $4—5 \times 10^5$ клеток/мл.

6.1.20. Вносят в каждый из 2 флаконов вместимостью 1 000 мл по 100—120 мл разведенной суспензии клеток и добавляют 10 % сыворотки, предварительно отконтролированной на присутствие посторонних вирусов и микоплазм.

6.2. Культивирование и подготовка перевиваемой клеточной культуры почки быка (МДВК)

6.2.1. Готовят во флаконе вместимостью 100 мл 50 мл смеси, состоящей из равных объемов 0,02 %-го раствора версена и 0,25 %-го раствора трипсина и нагревают ее до температуры (20 ± 2) °С.

6.2.2. Просматривают флаконы с МДВК вместимостью 1 000 мл под микроскопом при увеличении $70^{\times}$ и отбирают с полным монослоем клеток.

6.2.3. Сливают питательную среду из флаконов в сосуд для отходов и добавляют смесь версена и трипсина.

6.2.4. Оставляют клетки в смеси версена и трипсина при температуре (20 ± 2) °С и наблюдают за ними визуально.

6.2.5. Когда начнется «набухание» и слабое «отслоение» клеток от стекла (обычно через 15—20 мин), сливают смесь версена и трипсина в сосуд для отходов.

6.2.6. Флаконы с клеточной культурой помещают при температуре (37 ± 1) °С на 30—35 мин.

6.2.7. Добавляют во флаконы по 50 мл среды ДМЕМ и встряхивают их так, чтобы все клетки отделились от стекла.

6.2.8. Подсчитывают клетки в камере Горяева, как указано в п. 5.1.18.

6.2.9. Разводят клетки средой ДМЕМ с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 2×10^5 клеток/мл.

6.2.10. Вносят в каждый из 2 флаконов по 100—120 мл разведенной суспензии клеток и добавляют 10 % сыворотки, предварительно отконтролированной на присутствие посторонних вирусов и микоплазм.

6.2.11. Через 5—6 сут. просматривают флаконы под световым микроскопом и отбирают с полным монослоем клеток.

6.3. Выполнение контроля сыворотки на присутствие посторонних вирусов

При выполнении контроля сыворотки на присутствие посторонних вирусов должны быть выполнены следующие операции:

6.3.1. Отбирают по 1 флакону с клеточными культурами ТБ и МДВК для проверки испытуемой сыворотки и по 1 флакону с теми же культурами в качестве контрольных.

6.3.2. Сливают питательную среду из флаконов в сосуд для отходов.

6.3.3. Монослой клеток ТБ и МДВК промывают 3 раза средой ДМЕМ без сыворотки.

6.3.4. Вносят пипеткой в каждый из двух флаконов вместимостью 1 000 мл с клеточными культурами ТБ и МДВК по 25 мл испытуемой сыворотки так, чтобы разведение в среде не превышало 1 : 4 из расчета не менее 3 $см^2$ площади на 1 мл сыворотки.

Одновременно вносят пипеткой в каждый из двух контрольных флаконов вместимостью 1 000 мл с клеточными культурами ТБ и МДВК по 25 мл сыворотки, ранее отконтролированной на присутствие посторонних вирусов и микоплазм.

6.3.5. Инкубируют клеточные культуры ТБ и МДВК при температуре (20 ± 2) °С (60 ± 5) мин.

6.3.6. Сливают сыворотку и добавляют в опытные и контрольные флаконы с культурами ТБ и МДВК по 75 мл среды ДМЕМ.

Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С 14 сут.

6.3.7. С целью обнаружения цитопатогенного действия (ЦПД) просматривают опытные и контрольные клеточные культуры под микроскопом на 2, 5, 7, 10 и 14 сут.

6.3.8. Если в опытных и контрольных клеточны культурах не будет наблюдаться ЦПД, через 14 сут. их трижды замораживают при температуре минус (20 ± 2) °С и размораживают при температуре (37 ± 2) °С.

6.3.9. После размораживания культуры флаконы встряхивают, отбирают из каждого флакона с клеточными культурами ТБ и МДВК по 25 мл суспензии и вносят во флаконы с клетками того же вида. Два флакона с клеточными культурами ТБ и МДВК оставляют для контроля.

6.3.10. Вносят в опытные и контрольные клеточные культуры ТБ и МДВК по 75 мл среды ДМЕМ.

6.3.11. Клеточные культуры инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 14 сут.

Если в течение 14 сут. в опытных и контрольных клеточных культурах не наблюдается ЦПД, их проверяют на наличие гемадсорбирующих вирусов.

6.3.12. Сливают из флаконов питательную среду и промывают культуры 3 раза раствором Хенкса.

6.3.13. Добавляют в опытные и контрольные клеточные культуры по 50 мл 0,25 %-й взвеси куриных эритроцитов и эритроцитов морской свинки и инкубируют их при температуре (37 ± 2) °С.

6.3.14. Через 30—35 мин эритроциты из флаконов удаляют, а монослой промывают раствором Хенкса и просматривают под микроскопом при увеличении 70×.

6.4. Учет результатов

6.4.1. Если в клеточных культурах при первичной инокуляции сыворотки и в пассаже не выявлено ЦПД и не отмечено гемадсорбции, сыворотка признается пригодной.

6.4.2. Если при исследовании наблюдается ЦПД или отмечается гемадсорбция в испытуемых клеточных культурах при отсутствии в контроле, сыворотку бракуют.

6.4.3. Если ЦПД или гемадсорбция появились в контрольных и в опытных клеточных культурах, допускается однократный переконтроль сыворотки.

7. Контроль сыворотки на присутствие микоплазм

7.1. Микробиологический метод контроля сыворотки на присутствие микоплазм

Обнаружение микоплазм микробиологическим методом предусматривает внесение исследуемой сыворотки в бульонную питательную среду, инкубирование в течение 7 сут. и последующий высев на питательную среду, содержащую 0,3 % агара.

7.2. Чувствительность микробиологического метода

Микробиологический метод контроля сыворотки позволяет обнаруживать одну и более колоний микоплазм в объеме не более 100 мл сыворотки.

7.3. Приготовление бульонной среды

7.3.1. Для приготовления 1 л среды к 200 мл триптического гидролизата бычьего сердца (содержание сухих веществ 8—10 %) добавляют 400 мл мясного экстракта 1 : 2 (содержание сухих веществ 3,0—3,5 %), экстракт хлебопекарных дрожжей из расчета 1,5 г сухих веществ на 1 л среды, и 5,0 г хлорида натрия.

7.3.2. С помощью 10 %-го раствора NaOH устанавливают значение pH бульонной среды от 8,0 до 8,2.

7.3.3. Среду нагревают до кипения, кипятят 2—3 мин, фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

7.3.4. Разливают по 300—305 мл во флаконы, закрытые ватно-марлевыми или резиновыми пробками и завальцованные алюминиевыми колпачками, и стерилизуют автоклавированием при температуре 110 °С 30 мин. С помощью 5 %-го раствора соляной кислоты устанавливают pH от 7,8 до 8,0.

7.3.5. Для приготовления среды, содержащей 0,3 % агара, дополнительно вносят 3,0 г агара.

Готовые среды хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 4 мес.

7.4. Стерильность питательной среды

7.4.1. Для испытания на стерильность отбирают не менее 2 % от количества емкостей в серии. Определение проводят путем визуального просмотра каждого флакона с питательной средой после выдерживания в течение 44—48 ч при температуре (37 ± 1) °С и 14 сут. при температуре 20—25 °С.

7.4.2. В случае проростка хотя бы в одном флаконе бракуют всю серию. Далее питательная среда не используется.

7.5. Определение ростовых свойств среды, содержащей 0,3 % агара

Каждую серию приготовленной среды проверяют на ростовые свойства, используя тест-штамм Mycoplasma arginini G 230 (ОСО 42-28-378—05).

Среду считают чувствительной и признают годной, если результаты ее испытания соответствуют Инструкции по применению ОСО 42-28-378—05.

7.6. Подготовка сред для контроля

7.6.1. Перед употреблением полужидкую среду, содержащую 0,3% агара, разогревают в водяной бане до полного расплавления агара и охлаждают до температуры 40—45 °С.

7.6.2. Добавляют 15—20 % нормальной сыворотки крови лошади без консерванта, предварительно проверенной на стерильность и присутствие микоплазм, и 100 ед/мл бензилпенициллина натриевой соли.

7.6.3. Разливают по 10 мл в бактериологические пробирки и закрывают ватно-марлевыми пробками. Хранят среду при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

7.7. Выполнение контроля сыворотки на присутствие микоплазм микробиологическим методом

При выполнении контроля сыворотки микробиологическим методом должны быть выполнены следующие операции:

7.7.1. Вносят (300 ± 2) мл бульонной среды во флакон вместимостью 500 мл. Флакон закрывают ватно-марлевой пробкой.

7.7.2. Вносят (100 ± 2) мл исследуемой сыворотки в (300 ± 2) мл бульонной среды. Смесь инкубируют 7 сут при температуре (37 ± 1) °С и относительной влажности 80—90 %.

7.7.3. Отбирают 10 пробирок со средой, содержащей 0,3 % агара, и вносят в каждую пробирку по (1,0 ± 0,1) мл смеси исследуемой сыворотки и бульонной среды. Посев проводят прокалыванием всего столбика питательной среды, содержащейся в пробирке, концом пипетки вместимостью 1,0 мл, выпуская равномерно ее содержимое, начиная от дна до поверхности.

7.7.4. Инкубируют посевы 14 сут. при температуре (37 ± 1) °С и относительной влажности 80—90 %.

7.8. Учет результатов

7.8.1. Учет результатов проводят путем визуального просмотра засеянных пробирок в проходящем свете на 4, 7, 10, 14 сут.

7.8.2. Сыворотка считается свободной от микоплазм, если через 14 сут. не обнаруживают роста микоплазм ни в одной из засеянных пробирок.

7.8.3. В случае получения сомнительных результатов проводят повторный контроль.

7.8.4. При повторном контроле, при наличии роста микоплазм хотя бы в одной пробирке, сыворотка считается контаминированной микоплазмами.

8. Контроль сыворотки на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры (цитохимический метод)

Метод обнаружения микоплазм с использованием индикаторной клеточной культуры Vero основан на внесении испытуемой сыворотки в клеточную культуру и обработку препарата специфическим флюоресцирующим красителем Hoechst-33258, окрашивающим ДНК клеток и микоплазм. Возможно применение другого флюорохрома, аттестованного в ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Клеточную культуру Vero (или другую чувствительную к микоплазмам) получают из банка клеток, аттестованного в соответствии с требованиями ВОЗ в ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

8.1. Подготовка к выполнению контроля на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры

При подготовке к выполнению контроля сыворотки на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры должны быть выполнены следующие операции: приготовление основного и рабочего раствора красителя Hoechst-33258, подготовка люминесцентного микроскопа, подготовка предметных стекол.

8.1.1. Приготовление основного и рабочего раствора Hoechst-33258

Соблюдая стерильность, 5 мг концентрата Hoechst-33258 растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды (основной раствор).

Для получения рабочего раствора добавляют концентрат красителя в раствор Хенкса без индикатора в соотношении 1 : 9 и используют для окраски препаратов немедленно.

8.1.2. Подготовка люминесцентного микроскопа

Используют для анализа препаратов фильтры: ФС1-4, СС15-2, БС8-2.Просматривают препараты при увеличении ок. $10^{\times}$, об. $90^{\times}$ масляная иммерсия, или об. $70^{\times}$ или об. $85^{\times}$ водная иммерсия.

8.1.3. Подготовка предметных стекол

Промывают стекла в проточной водопроводной воде в течение 10—15 мин. Помещают стекла в сосуд с дистиллированной водой и кипятят 5—7 мин. После охлаждения до температуры 20—22 °С извлекают стекла с помощью пинцета и помещают в чашку Петри. Протирают каждое стекло стерильной салфеткой и помещают на 1 сут. в смесь Никифорова, состоящую из равных объемов 96° этилового спирта и

эфира для наркоза. Извлекают стекла с помощью пинцета из смеси Никифорова и протирают каждое стекло стерильной салфеткой. Стерилизуют стекла (30 ± 2) мин при температуре (120 ± 2) °С.

8.2. Выполнение контроля сыворотки на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры

При проведении испытания на присутствие микоплазм методом индикаторной клеточной культуры выполняют следующие операции:

8.2.1. Вносят 1 мл испытуемого материала в чашку Петри диаметром 90 мм, содержащую стерильное предметное стекло и 20—23 мл суспензии клеточной культуры Vero в концентрации 10^5 кл/мл.

8.2.2. Инкубируют чашку Петри с клеточной культурой Vero в течение 3—5 сут. при температуре (37 ± 1) °С в анаэробных условиях до формирования 50—70 % монослоя. Образование монослоя наблюдают в световом микроскопе при увеличении ок. $10^{\times}$, об. $20^{\times}$.

8.2.3. Сливают культуральную жидкость, промывают препарат питательной средой или буфером (pH 7,2— 7,4).

8.2.4. Помещают предметное стекло на 30—35 мин в 96° этиловый спирт.

Сливают спирт и высушивают препарат на воздухе.

8.2.5. Добавляют рабочий раствор красителя Hoechst-33258 и окрашивают в темноте при температуре (37 ± 1) °С в течение 30—35 мин.

8.2.6. Сливают краситель, промывают препарат стерильной дистиллированной водой, подсушивают на воздухе и микроскопируют.

8.3. Учет результатов

Учет результатов испытания на присутствие микоплазм методом окрашивания ДНК флюорохромом Hoechst-33258 на индикаторной культуре клеток Vero проводят путем просмотра препаратов в люминесцентном микроскопе.

Микоплазмы выглядят, как однородно окрашенные тела сферической формы, имеющие вид отдельных, парных, цепочечных или нитевидных образований яркого зеленоватого свечения. Диаметр обычно находится в пределах 0,1—0,3 микрона.

Микоплазмы в виде ярко светящейся зернистости на фоне темной цитоплазмы выявляют по периферии клеток и в межклеточном пространстве.

Условно интенсивность контаминации микоплазмами обозначают знаками креста:

1 крест – единичные микоплазмы в препарате;
2 креста – небольшие скопления микоплазм в поле зрения;
3 креста – отдельные микоплазмы и скопления в 20—50 % клеток;
4 креста – максимальное количество микоплазм в виде скоплений в межклеточном пространстве в каждом поле зрения.

В качестве положительных контрольных образцов используют заведомо контаминированные микоплазмами клеточные культуры.

Отрицательными контрольными образцами служат клеточные культуры, в которых описанные выше светящиеся образования не выявлены.

Обнаружение микоплазм в препаратах на индикаторной клеточной культуре Vero свидетельствует о контаминации испытуемого материала микоплазмами.

В случае получения сомнительных результатов следует проводить повторный контроль.

Окончательный ответ о присутствии микоплазм в сыворотке будет учитывать результаты двух методов: микробиологического и метода индикаторной клеточной культуры.

В случае обнаружения микоплазм хотя бы одним методом сыворотка считается контаминированной и бракуется.

Приложение

Таблица 1

Контроль сыворотки крови крупного рогатого скота на присутствие посторонних вирусов

Клеточные культуры	Результаты контроля	
	ЦПД	Гемадсорбция
Первично-трипсинизированная клеточная культура ТБ	не обнаружено	не обнаружено
Перевиваемая клеточная культура МДВК	не обнаружено	не обнаружено

Таблица 2

Контроль сыворотки крови крупного рогатого скота на присутствие микоплазм

Методы	Результаты контроля
Микробиологический (посев на питательные среды)	Отсутствие роста
Цитохимический	Отсутствие люминесцентного свечения в индикаторной клеточной культуре Vero

gost.e-ecolog.ru