

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя

Россельхознадзора

Е.А. Непоклонов

“18” сентября 2007 г

Инструкция
по применению «Набора препаратов для дифференциальной
иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней,
классической чумы свиней и болезни Ауески»

(организация-производитель – ГНУ ВНИИВВиМ
Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл.)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор препаратов для дифференциальной иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней (АЧС), классической чумы свиней (КЧС) и болезни Ауески (БА).

2. Набор предназначен:

- для обнаружения антигенов вирусов АЧС и КЧС в мазках-отпечатках проб органов в реакции прямой иммунофлуоресценции (РПИФ);
- для обнаружения и идентификации вируса АЧС в РПИФ или в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) в культурах лейкоцитов свиньи (ЛС) или клеток костного мозга свиньи (ККМС), инокулированных исследуемым материалом от павших или вынужденно убитых больных свиней;
- для обнаружения и идентификации вирусов КЧС и БА в РПИФ или РНИФ в перевиваемой культуре клеток почки поросенка (РК-15), инокулированной исследуемым материалом от павших или вынужденно убитых больных свиней;
- для обнаружения специфических антител к вирусам АЧС, КЧС и БА в сыворотках крови переболевших свиней в РНИФ;
- для обнаружения и титрования нейтрализующих антител к вирусу КЧС в реакции нейтрализации флуоресцирующих микробляшек (РНФМ).

3. В состав набора входят:

- ФИТЦ-иммуноглобулины АЧС свиные, $0,5 \text{ см}^3$ - 1 ампула;
- ФИТЦ-иммуноглобулины КЧС свиные, $0,5 \text{ см}^3$ - 1 ампула;
- ФИТЦ-иммуноглобулины болезни Ауески свиные, $0,5 \text{ см}^3$ - 1 ампула;
- ФИТЦ-иммуноглобулины антисвиньи, $0,5 \text{ см}^3$ - 3 ампулы;
- специфическая (положительная) сыворотка АЧС свиная, $0,5 \text{ см}^3$ - 1 ампула;

• специфическая (положительная) сыворотка КЧС свиная, $0,5 \text{ см}^3$ - 1 ампула;

• иммуноглобулины болезни Ауески, свиные, $0,5 \text{ см}^3$ - 1 ампула;

• нормальная (отрицательная) сыворотка свиньи, $0,5 \text{ см}^3$ - 1 ампула.

4. По внешнему виду иммуноглобулинов и сыворотки – сухая однородная пористая масса белого или светло-серого цвета, ФИТЦ-иммуноглобулины - сухая однородная пористая масса желтого или оранжевого цвета.

5. Компоненты набора расфасованы по $0,5 \text{ см}^3$ в стеклянные ампулы вместимостью 2,0; 3,0 или $5,0 \text{ см}^3$, герметически запаянные.

6. На ампулы с препаратами должна быть наклеена этикетка с указанием наименования препарата, объема, рабочего разведения, номера серии и контроля, даты изготовления и срока годности.

7. На каждую коробку набора должна быть наклеена этикетка с указанием наименования организации-производителя и ее товарного знака, адреса, наименования набора, перечня и количества препаратов входящих в состав набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения и обозначения настоящих СТО. В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

8. Набор хранят в организации-производителе, у потребителя и транспортируют всеми видами транспорта при температуре от 4°C до 8°C в сухом темном месте.

9. Препараты набора без этикеток, с нарушением целостности ампул, изменением цвета, консистенции или с истекшим сроком годности обеззараживают кипячением в течение 30 мин.

10. Срок годности составляет 24 месяца со дня изготовления. Набор по истечении срока годности не применяют.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

11. РПИФ основана на взаимодействии ФИТЦ-иммуноглобулинов (АЧС, КЧС или БА) со специфическими антигенами гомологичного вируса, с последующим выявлением образовавшегося комплекса методом флуоресцирующих антител в отраженном синем свете на люминесцентном микроскопе.

12. РНИФ основана на взаимодействии ФИТЦ-иммуноглобулинов анти-свиных с сывороткой свиньи, при связывании специфических к вирусу (АЧС, КЧС или БА) антител с антигеном гомологичного вируса, и последующим выявлением образовавшегося комплекса методом флуоресцирующих антител в отраженном синем свете на люминесцентном микроскопе.

13. РНФМ основа на взаимодействии специфических антител в сыворотке крови свиней с вирусом КЧС, с последующим выявлением отсутствия микробляшек, образуемых вирусом КЧС в культуре клеток методом флуоресцирующих антител в отраженном синем свете на люминесцентном микроскопе.

14. Каждая упаковка набора рассчитана на исследование 34 проб биологического материала (по 10 проб на каждую инфекцию) и 34 проб сывороток крови свиней, включая контроли.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

15. Взятие и подготовка биологического материала для исследования

15.1. Для исследования берут пробы крови, миндалин, подчелюстных и мезентериальных лимфатических узлов, селезенки, легкого и почки от 2-5 животных, убитых в стадии агонии или не позже чем через 2-3 ч после гибели.

15.2. Для серологических исследований берут пробы крови от 5-10 животных, по 5-8 см³ с соблюдением правил асептики из корональной поллой вены, хвостовой или ушной артерии, после установления признаков болезни и через 2 недели после начала заболевания.

15.3. Пробы указанных органов по 5-10 граммов помещают в стерильные флаконы, которые герметически закрывают резиновыми пробками, этикетируют, обрабатывают 5,0 %-ным раствором хлорамина Б или осветленным 20,0 %-ным раствором хлорной извести, обвёртывают марлей, смоченной одним из указанных дезинфицирующих растворов, укладывают в полиэтиленовые пакеты, герметично завязывают и помещают в термос со льдом. Если транспортировка занимает более чем 24 часа, образцы должны быть заморожены и отосланы в сухом льду. Термос помещают в металлический контейнер, опечатывают и доставляют нарочным в лабораторию с сопроводительным документом.

16. Подготовка материала к исследованию

16.1. Пробы органов очищают от жировой и соединительной ткани, готовят навески по 2-3 г, тщательно растирают в отдельной стерильной ступке со стерильным стеклянным песком и готовят 20 %-ную суспензию на стерильном 0,85%-ном растворе хлористого натрия рН 7,0-7,5. Суспензии дважды замораживают при минус 20 °С, оттаивают при (37+0,5) °С и центрифугируют 20 мин на холоду (4±2) °С при 2500-3000 об/мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость (экстракт) отсасывают, вносят в него по 200 ЕД/см³ пенициллина и стрептомицина, выдерживают 1 час при (37+0,5) °С и используют для исследований в качестве антигена.

16.2. Для получения сыворотки пробы крови выдерживают 1 час в термостате при (37+0,5) °С или при комнатной температуре (18-20) °С до образования сгустка, делают обводку сгустка и переносят в холодильник на 10-14 часов при (4±2,0) °С. После наступления максимальной ретракции сыворотку отсасывают и используют для исследований.

17. Подготовка компонентов набора для проведения исследований

Лиофилизированные препараты набора перед использованием растворяют в стерильной дистиллированной воде до объема указанного на этикетке компонента.

18. Обнаружение антигенов вирусов АЧС и КЧС в мазках-отпечатках проб органов в реакции прямой иммунофлуоресценции (РПИФ).

18.1. Приготовление мазков-отпечатков

Мазки-отпечатки из испытуемых проб органов свиней готовят на обезжиренных спирт-эфиром (1:1) стеклянных пластинках изготовленных из покровных стекол, укрепленных в расщепках палочек из спичек с условными номерами. Мазок-отпечаток делают, прикладывая стекло к поверхности среза исследуемого органа. Для каждого отпечатка делается новый срез органа. Мазки-

отпечатки высушивают на воздухе при комнатной температуре, помещают в химический стакан и фиксируют химически чистым холодным ацетоном в течение 10-15 минут. Затем мазки высушивают, после чего они готовы для постановки реакции прямой иммунофлуоресценции. Контрольные мазки-отпечатки готовят аналогично из проб органов здоровых, невакцинированных животных. Допускается хранение фиксированных мазков-отпечатков при минус 20 °С в течение семи суток.

18.2. Постановка РПИФ - окрашивание мазков-отпечатков

Подготовленные мазки-отпечатки помещают на капли соответствующих ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС или КЧС, нанесенные в рабочем разведении на края предметных стекол. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Затем мазки-отпечатки снимают с предметных стекол, ополаскивают в 0,01М ФСБ (рН 7,0-7,5) и свободными концами спичек укрепляют в гнездах деревянного штатива. Штатив помещают в цилиндрическую банку с 0,01 М ФСБ (рН 7,0-7,5), установленную на магнитную мешалку. Отмывание тест-препаратов от несвязавшихся или неспецифически связавшихся ФИТЦ-иммуноглобулинов ведут в течение 20 мин в темном месте, сменяя ФСБ через 10 мин. После отмывания тест-препараты ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают на воздухе и заключают в забуференный раствор глицерина для иммунофлуоресцентной микроскопии (9 частей глицерина и 1 часть ФСБ рН 7,0-7,5). Края тест-препаратов заливают расплавленным парафином.

18.3. Учет результатов

18.3.1. Обнаружение антигена вируса АЧС.

При люминесцентной микроскопии мазков-отпечатков на АЧС исследуют пробы селезенки, лимфатических узлов, легкого, костного мозга. Специфическую флуоресценцию учитывают в клетках лимфоидного ряда, макрофагах (нейтрофилы, моноциты). Она характеризуется ярким желто-зеленым свечением гранул, бобовидных включений в цитоплазме или диффузного зеленого свечения всей цитоплазмы. Не следует учитывать флуоресцирующие клетки, в которых не различаются ядро, а также дегенерированные клетки. Оценку результатов микроскопии проводят по условной четырех крестовой шкале при увеличении 5х40:

++++ - сверкающая, желто-зеленая флуоресценция клеток с включениями или очаговыми флуоресцирующими комплексами диффузного и гранулярного антигена, в каждом поле зрения. Результат положительный

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

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

+ - яркая, зеленая флуоресценция единичных клеток с включениями (3-5 клеток в мазке-отпечатке). Результат положительный;

- - нечеткая, серо-зеленая тусклая диффузная флуоресценция клеток. Результат отрицательный.

18.3.2. Обнаружение антигена вируса КЧС

При люминесцентной микроскопии мазков-отпечатков на КЧС исследуют

пробы селезенки, лимфатических узлов почки и легкого животных, ранее не вакцинированных против КЧС. Специфическую флуоресценцию учитывают в лимфоидных клетках паренхимы селезенки и лимфоузлах, расположенных группами, и клетках эпителия почечных канальцев, расположенных одиночно, группами или в виде сплошного монослоя. Флуоресценция характеризуется ярким диффузным свечением цитоплазмы.

Оценка результатов микроскопии проводится по условной четырехкратной шкале при увеличении 5х40:

++++ - обнаружение сплошного монослоя клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией. Результат положительный;

+++ - обнаружение единичных групп, состоящих из 10 и более клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в каждом поле зрения. Результат положительный;

++ - обнаружение единичных групп, состоящих из 10 и более клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в 5-10 полях зрения. Результат положительный;

+ - обнаружение единичных групп, состоящих из 3-5 клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в 1-5 полях зрения. Результат положительный;

- - отсутствие в мазках-отпечатках клеток с цитоплазматической флуоресценцией. Свечение клеток тускло-зеленое, нечеткое. Результат отрицательный.

19. Выделение и идентификация вирусов АЧС, КЧС и БА в зараженных культурах клеток

19.1. Выделение и идентификация вируса АЧС в зараженных культурах ЛС и ККМС, в РПИФ и РНИФ

19.1.1. Выделение вируса АЧС в культуре клеток

Культуру клеток ЛС или ККМС выращенную на стеклянных пластинках из покровных стекол в пробирках или в чашках Карреля, инокулируют экстрактами суспензий органов и кровью (п.15 и п.16) без удаления ростовой среды. На каждую пробу берут по 4 чашки или 8-10 пробирок: в 2 чашки вносят по 1,0 см³, в оставшиеся 2 чашки - по 0,1 см³, в пробирки по 0,1 см экстракта суспензии. Инкубируют при (37±0,5) °С. Через 24, 48, 72, 96 и 192 часа после инокуляции культуру клеток просматривают под световым микроскопом на наличие гемадсорбции.

19.1.2. Идентификация вируса АЧС в культуре клеток в РПИФ и РНИФ

Стеклянные пластинки с культурой ЛС или ККМС, инокулированной испытуемыми материалами, извлекают из пробирок через 24, 48, 72, 96 часов, укрепляют в расщепы спичек с условными номерами. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, помещают в химический стакан и фиксируют химически чистым холодным ацетоном в течение 10-15 минут, высушивают и ставят РПИФ и РНИФ.

При отсутствии культур клеток, выращенных на стеклянных пластинках в пробирках, клетки ЛС или ККМС механически снимают со стекла чашек Карреля через 72-192 часа после инокуляции испытуемого материала, сливают в

пробы селезенки, лимфатических узлов почки и легкого животных, ранее не вакцинированных против КЧС. Специфическую флуоресценцию учитывают в лимфоидных клетках паренхимы селезенки и лимфоузлах, расположенных группами, и клетках эпителия почечных канальцев, расположенных одиночно, группами или в виде сплошного монослоя. Флуоресценция характеризуется ярким диффузным свечением цитоплазмы.

Оценка результатов микроскопии проводится по условной четырехкрестовой шкале при увеличении 5х40:

++++ - обнаружение сплошного монослоя клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией. Результат положительный;

+++ - обнаружение единичных групп, состоящих из 10 и более клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в каждом поле зрения. Результат положительный;

++ - обнаружение единичных групп, состоящих из 10 и более клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в 5-10 полях зрения. Результат положительный;

+ - обнаружение единичных групп, состоящих из 3-5 клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в 1-5 полях зрения. Результат положительный;

- - отсутствие в мазках-отпечатках клеток с цитоплазматической флуоресценцией. Свечение клеток тускло-зеленое, нечеткое. Результат отрицательный.

19. Выделение и идентификация вирусов АЧС, КЧС и БА в зараженных культурах клеток

19.1. Выделение и идентификация вируса АЧС в зараженных культурах ЛС и ККМС, в РПИФ и РНИФ

19.1.1. Выделение вируса АЧС в культуре клеток

Культуру клеток ЛС или ККМС выращенную на стеклянных пластинках из покровных стекол в пробирках или в чашках Карреля, инокулируют экстрактами суспензий органов и кровью (п.15 и п.16) без удаления ростовой среды. На каждую пробу берут по 4 чашки или 8-10 пробирок: в 2 чашки вносят по 1,0 см³, в оставшиеся 2 чашки - по 0,1 см³, в пробирки по 0,1 см экстракта суспензии. Инкубируют при (37±0,5) °С. Через 24, 48, 72, 96 и 192 часа после инокуляции культуру клеток просматривают под световым микроскопом на наличие гемадсорбции.

19.1.2. Идентификация вируса АЧС в культуре клеток в РПИФ и РНИФ

Стеклянные пластинки с культурой ЛС или ККМС, инокулированной испытуемыми материалами, извлекают из пробирок через 24, 48, 72, 96 часов, укрепляют в расщепы спичек с условными номерами. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, помещают в химический стакан и фиксируют химически чистым холодным ацетоном в течение 10-15 минут, высушивают и ставят РПИФ и РНИФ.

При отсутствии культур клеток, выращенных на стеклянных пластинках в пробирках, клетки ЛС или ККМС механически снимают со стекла чашек Карреля через 72-192 часа после инокуляции испытуемого материала, сливают в

пенициллиновые флаконы, суспензию центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 минут. Надсадок (ростовая среда) удаляют, суспензию клеток наносят на обезжиренные покровные стекла, вставленные в расщепы спичек с условными номерами, высушивают и фиксируют в ацетоне (п.18.1).

Отрицательные тест-препараты готовят аналогично, исключая этап заражения культуры клеток ЛС или ККМС.

РПИФ ставят (п.18.2) используя для иммунофлуоресцентной обработки препаратов ФИТЦ-иммуноглобулины АЧС в рабочем разведении.

19.1.3. Учет и оценка результатов на наличие вируса АЧС

Учет и оценку результатов люминесцентной микроскопии проводят, как описано в п. 18.3.1.

При получении отрицательного результата, проводят два последовательных прямых пассажа в культуре клеток ЛС или ККМС с одновременным исследованием на АЧС в РПИФ или РНИФ.

При отсутствии ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС для идентификации специфического антигена вируса АЧС в зараженной культуре клеток лейкоцитов или ККМС ставят РНИФ (п.20.2.).

19.2. Выделение и идентификация вирусов КЧС и БА

19.2.1. Выделение вирусов в культуре клеток РК-15

В каждую пробирку с выращенной на покровных стеклах культурой клеток РК-15, вносят по 0,5 см³ суспензий органов или крови (п. 16.1.), инокулируют с предварительным удалением ростовой среды. На каждую пробу берут 8 пробирок. Пробирки помещают в термостат при (37±0,5) °С на 2 ч. Затем, удалив вируссодержащую жидкость, вносят 2,0 см³ среды Игла (МЕМ), содержащей 2,0 % сыворотки эмбриона КРС (поддерживающая среда). Пробирки инкубируют при (37±0,5) °С и через 24, 48 и 72 часа после заражения культуру клеток просматривают под световым микроскопом на наличие неспецифической дегенерации клеток или ЦПД. В случае появления дегенерации клеток поддерживающую среду меняют на свежую.

19.2.2. Идентификация вирусов КЧС и БА в культуре клеток РК-15 в РПИФ и РНИФ

Пластинки с культурой клеток РК-15, инокулированной испытуемыми материалами, через 24, 48 и 72 часа извлекают из пробирок, укрепляют в расщепы спичек с условными номерами. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, помещают в химический стакан и фиксируют химически чистым холодным ацетоном в течение 10-15 минут, высушивают и проводят РПИФ или РНИФ.

РПИФ ставят (п.18.2), используя ФИТЦ-иммуноглобулины КЧС или БА в рабочем разведении. РНИФ ставят (п.20.2.) ставят, используя антисвиные ФИТЦ-иммуноглобулины.

19.2.3. Учет и оценка результатов на наличие вируса КЧС

В зависимости от количества вируса и времени культивирования специфический антиген обнаруживается по яркому желто-зеленому диффузному свечению цитоплазмы пораженных клеток, расположенных группами различной величины (флуоресцирующие микробляшки). При наличии в исходном мате-

риале вируса в высокой концентрации ($5,0-6,0 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{см}^3$) отчетливое нежно-гранулярное свечение цитоплазмы нескольких клеток (5-10), образующих флуоресцирующую микробляшку, обнаруживают через 24 часа после заражения. Количество таких клеток через 48 часов культивирования увеличивается до 20-40. Через 72 часа после заражения количество пораженных клеток в флуоресцирующих микробляшках увеличивается до 50-100. Обнаруживаются также флуоресцирующие микробляшки, состоящие из 3-6 пораженных клеток (вторичные флуоресцирующие микробляшки). При поражении всех клеток монослоя интенсивность флуоресценции заметно снижается.

Обнаружение в препаратах культуры клеток РК-15 через 24, 45 или 72 часа после заражения флуоресцирующих микробляшек считается положительным результатом люминесцентной микроскопии на КЧС.

Обнаружение в препаратах культуры клеток РК-15 через 24, 48 и 72 часа после инокуляции испытуемого материала нечеткого, зеленовато-сизого или тусклого свечения цитоплазмы считается отрицательным результатом люминесцентной микроскопии на КЧС. В случае получения отрицательного результата проводят два последовательных прямых пассажа в культуре клеток РК-15 с одновременным исследованием на КЧС в РПИФ или РНИФ.

19.2.4. Учет и оценка результатов на наличие вируса БА

В зависимости от количества вируса и времени культивирования специфический антиген обнаруживается по яркой желто-зеленой флуоресценции в цитоплазме и ядре пораженных клеток в виде гранул, а также диффузного свечения цитоплазмы. Содержащие антиген клетки могут быть расположены группами, в виде флуоресцирующих микробляшек.

Обнаружение в препаратах культуры клеток РК-15 через 24, 48 или 72 часа после заражения флуоресцирующих микробляшек, считается положительным результатом люминесцентной микроскопии на наличие вируса БА.

Обнаружение в препаратах культуры клеток РК-15 через 24, 48 и 72 часа после инокуляции испытуемого материала нечеткого, зеленовато-сизого или тусклого свечения цитоплазмы считается отрицательным результатом люминесцентной микроскопии на наличие вируса БА. В случае получения отрицательного результата проводят два последовательных прямых пассажа в культуре клеток РК-15 с одновременным исследованием на БА в РПИФ или РНИФ, как описано выше.

19.2.5. При отсутствии ФИТЦ-иммуноглобулинов КЧС или БА для идентификации специфического антигена вирусов КЧС и БА в зараженной культуре клеток РК-15 ставят РНИФ (п.20.2.)

20. Выявление антигена вирусов АЧС, КЧС и БА в РНИФ

20.1. Приготовление культуральных тест-препаратов вирусов АЧС, КЧС и БА

20.1.1. Приготовление культуральных тест-препаратов вируса АЧС

Культуру клеток РК-15 выращивают на стеклянных пластинах из покровных стекол в пробирках на среде Игла (МЕМ) с 5,0 % сыворотки эмбриона КРС. После формирования монослоя среду удаляют и вносят $1,0 \text{ см}^3$ вируса АЧС (штамм ФК 32/135, культура клеток ККМС, активность $6,0-7,0 \lg$

ГAE₅₀/см³), разведённого средой Игла (МЕМ) 1:1000. Через 2 часа инкубирования при (37±0,5) °С в пробирки вносят 2,0 см³ среды Игла (МЕМ) с 2,0 % сыворотки эмбриона КРС. Через 72 часа инкубирования, пластины с хорошим состоянием монослоя извлекают из пробирок, укрепляют в расщепы спичек, высушивают на воздухе при комнатной температуре (30-60 мин) и фиксируют охлажденным ацетоном в течение 10-15 мин при температуре от 4 до 8°С (положительные тест-препараты) (п.17.1.) и проверяют их пригодность для постановки РНИФ. При наличии в культуральных тест-препаратах антигена вируса АЧС 5-10 и более флуоресцирующих (антигенсодержащих) клеток в каждом поле зрения люминесцентного микроскопа при увеличении 5х40 их используют для постановки РНИФ.

20.1.2. Приготовление культуральных тест-препаратов КЧС

Культуру клеток РК-15 выращенную на стеклянных пластинках из покровных стекол в пробирках (п. 20.1.1), инфицируют вирусом КЧС (штамм ЛК-ВНИИВВиМ, 10-15 пассаж в культуре клеток РК-15 или ТЯ, активность 4,0-5,0 lg ККИД₅₀/см³) в дозе 1000 ККИД₅₀/см³, в объеме 1,0 см³. Через 2 часа инкубирования при (37±0,5)°С вирусосодержащую жидкость удаляют и заливают средой Игла (МЕМ) с 2,0 % сыворотки эмбриона КРС по 2,0 см³ на пробирку. После 48-72 часов культивирования при (37±0,5)°С пластинки с зараженной культурой клеток извлекают из пробирок, высушивают на воздухе и обрабатывают охлажденным ацетоном в течение 10 мин при температуре от 4 до 8°С (п.18.1.) и проверяют их пригодность для постановки РНИФ в реакции прямой иммунофлуоресценции. При наличии в культуральных тест-препаратах антигена вируса КЧС от 2-х до 10 флуоресцирующих микробляшек в каждом поле зрения люминесцентного микроскопа при увеличении 5х10 их используют для постановки РНИФ.

20.1.3. Приготовление культуральных тест-препаратов БА

Культуру клеток РК-15 выращенную на стеклянных пластинках из покровных стекол в пробирках (п. 20.1.1), заражают вирусом БА (штамм БУК 900, культура клеток КФ, активность 5,0-5,5 lg ТЦД₅₀/см³) в дозе 1000 ТЦД₅₀/см³, в объеме 1,0 см³ на пробирку. Через 2 часа инкубирования при (37±0,5) °С вирусосодержащую жидкость удаляют и заливают средой Игла (МЕМ) с 2,0 % сыворотки эмбриона КРС по 2,0 см³ на пробирку. После 24-48 часов культивирования при (37±0,5) °С пластинки с зараженной культурой клеток извлекают из пробирок, высушивают на воздухе и обрабатывают охлажденным ацетоном в течение 10 мин при температуре от 4 до 8°С (п.18.1.) и проверяют их пригодность для постановки РНИФ в реакции прямой иммунофлуоресценции. При наличии в культуральных тест-препаратах антигена вируса БА 10 и более флуоресцирующих клеток или микробляшек в каждом поле зрения люминесцентного микроскопа при увеличении 5х10, их используют для постановки РНИФ.

20.3 Постановка РНИФ для выявления антигенов

В качестве положительного контроля используют культуральные тест-препараты вирусов АЧС, КЧС и БА

Испытуемые и контрольные (положительный и отрицательный контроль) образцы культур клеток помещают на капли иммуноглобулинов болезни Ауески, специфической (к вирусам АЧС, КЧС или БА) и нормальной сывороток, взятых в рабочем разведении, нанесенные на края предметных стекол. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Затем мазки-отпечатки снимают с предметных стекол, ополаскивают в 0,01М ФСБ (рН 7,0-7,5) и свободными концами спичек укрепляют в гнездах деревянного штатива. Штатив помещают в цилиндрическую банку с 0,01 М ФСБ (рН 7,0-7,5), установленную на магнитную мешалку. Отмывание тест-препаратов от несвязавшихся или неспецифически связавшихся антител проводят в 0,01М ФСБ рН 7,0-7,5 в течение 20 минут со сменой буферного раствора через 10 минут. Затем тест-препараты подсушивают на воздухе и помещают на капли раствора антисвиных ФИТЦ-иммуноглобулинов (рабочее разведение), нанесенные на края предметных стекол. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, затем препараты отмывают как описано выше в темном месте и готовят для люминесцентной микроскопии (п.18.2.).

20.3.1. Учет и оценка результатов по п.18.3.

21. Выявление специфических антител к вирусам АЧС, КЧС и БА в РНИФ

21.1. Постановка РНИФ для выявления антител

Культуральные тест-препараты (специфические и нормальные) помещают на капли испытуемых сывороток в разведении 1:20, а также контрольных (специфические и нормальная) сывороток в рабочем разведении, нанесенные на края предметных стекол во влажной камере. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Затем мазки-отпечатки снимают с предметных стекол, ополаскивают в 0,01М ФСБ (рН 7,0-7,5) и свободными концами спичек укрепляют в гнездах деревянного штатива. Штатив помещают в цилиндрическую банку с 0,01 М ФСБ (рН 7,0-7,5), установленную на магнитную мешалку. Отмывание тест-препаратов от несвязавшихся или неспецифически связавшихся антител проводят в 0,01М ФСБ рН 7,0-7,5 в течение 20 минут со сменой буферного раствора через 10 минут. Затем тест-препараты подсушивают на воздухе и помещают на капли раствора антисвиных ФИТЦ-иммуноглобулинов (рабочее разведение), нанесенные на края предметных стекол. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, затем препараты отмывают как описано выше в темном месте и готовят для люминесцентной микроскопии (п.17.2.).

21.1.2. Учет и оценка результатов

Учет и оценку результатов РНИФ проводят по интенсивности свечения антигенсодержащих клеток культуральных тест-препаратов АЧС, КЧС и БА по условной четырехкрестовой шкале:

++++ - яркое желто-зеленое свечение вирусспецифических антигенов, клеток специфических тест-препаратов АЧС, КЧС и БА. Специфические антитела в испытуемой пробе в титре выше 1:20. Результат положительный;

++ - умеренное зеленое свечение вирусспецифических антигенов клеток

специфических тест-препаратов АЧС, КЧС и БА антитела в предельных разведениях сыворотки при количественном исследовании испытуемых проб. Результат положительный; аналогичное свечение при качественном исследовании испытуемой пробы сыворотки в разведении 1:20 - результат сомнительный;

- отсутствие специфического свечения антигенсодержащих клеток тест-препаратов АЧС, КЧС и БА - результат отрицательный.

В случае сомнительного результата необходимо исследовать сыворотку крови животного через две недели после первого взятия. При получении повторного сомнительного результата сыворотку считают отрицательной.

В случае положительного результата при качественном исследовании сывороток в разведении 1:20 проводят количественное исследование испытуемых материалов в разведениях 1:20; 1:40; 1:80; 1:160, 1:320 и т.д.

22. Выявление нейтрализующих антител к вирусу КЧС в РНФМ

22.1. Титрование вируса КЧС.

Готовят десятикратные разведения вируса КЧС (штамм ЛК-ВНИИВВиМ, 10-15 пассаж в культуре клеток РК-15 или ТЯ, активность $4,0-5,0 \lg \text{ККИД}_{50}/\text{см}^3$) от 10^{-1} – 10^{-6} на среде Игла (МЕМ) и вносят по $0,5 \text{ см}^3$ в пробирки с культурой клеток РК-15, выращенной на стеклянных пластинках из покровных стекол предварительно удалив ростовую среду. На каждое разведение вирусосодержащего материала берут по 4 пробирки. После двухчасовой экспозиции при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ вирусосодержащую жидкость удаляют и пробирки заливают средой Игла (МЕМ) с 2,0% сыворотки эмбрионов КРС и инкубируют 72 часа при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Затем пластинки вынимают из пробирок, готовят препараты для РПИФ (п.18.2). Титром вируса КЧС считают наибольшее его разведение, при котором в цитоплазме клеток обнаруживается специфическая флуоресценция цитоплазматического антигена вируса (п.18.3.2.). Титр вируса вычисляют по методу Рида и Менча, выражая его в клеточно-культуральных инфекционных дозах ($\text{ККИД}_{50}/\text{объем}$).

22.2. Постановка РНФМ

Испытуемые и контрольные (специфическая сыворотка КЧС, нормальная сыворотка свиньи) сыворотки прогревают при 56°C в течение 30 минут и готовят разведения на среде Игла МЕМ от 1:2 до 1:8. В пробирки с разведёнными сыворотками вносят равный объём $1000 \text{ ККИД}_{50}/\text{см}^3$ вируса КЧС, тщательно встряхивают и инкубируют в течение 60 минут в термостате при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. После инкубации, вносят по $0,5 \text{ см}^3$ смеси в пробирки с выращенной на стеклянных пластинках из покровных стекол культурой клеток РК-15. Ростовую среду перед внесением смеси удаляют. На каждое разведение сыворотки берут по 4 пробирки. Через 2 часа смесь удаляют, монослой дважды промывают и заливают средой Игла МЕМ с 2,0% сыворотки эмбриона КРС. Культуру клеток просматривают под малым увеличением светового микроскопа для контроля спонтанной дегенерации клеток каждые 24 часа. Через 48 часов после внесения смеси пластинки вынимают из пробирок, готовят препараты, ставят реакцию прямой иммунофлуоресценции (18.2.).

22.3. Учет и оценка результатов

Отсутствие флуоресцирующих микробляшек (при наличии их в контроле

вируса в смеси с нормальной сывороткой свиньи) в препаратах, обработанных смесью вируса КЧС с рабочим разведением специфической сыворотки КЧС и испытуемыми сыворотками в разведении 1:2 и выше, указывает на наличие в испытуемых материалах нейтрализующих антител к вирусу КЧС - результат положительный.

Предельное разведение сыворотки, при котором наблюдается полное (100%) подавление образования флуоресцирующих микробляшек (нейтрализация вируса) считают титром нейтрализующих антител испытуемой сыворотки.

Наличие флуоресцирующих микробляшек в препаратах, обработанных смесью вируса КЧС и испытуемых сывороток в разведении 1:2 и выше, указывает на отсутствие в испытуемых материалах нейтрализующих антител к вирусу КЧС - результат отрицательный.

23. Диагностическая оценка результатов дифференциальных исследований на АЧС, КЧС и БА

Постановку диагноза проводят на основании результатов дифференциальных исследований методом флуоресцирующих антител с учетом данных других вирусологических и серологических методов исследований, включенных в схему лабораторных исследований АЧС, КЧС и БА: реакция гемадсорбции, иммуноферментный анализ, биопроба на свиньях.

23.1. Африканская чума свиней

23.1.1. Выделение вируса в культуре ЛС или ККМС, инокулированной испытуемым материалом, и его идентификация в РПИФ или реакции гемадсорбции оценивается как положительный результат и ставится диагноз - африканская чума свиней.

При получении отрицательных результатов после проведения трех последовательных пассажей испытуемого материала в культуре ЛС (ККМС) или биопробы на свиньях ставится отрицательный диагноз.

23.1.2. Обнаружение антигена вируса АЧС в мазках-отпечатках испытуемого материала в РПИФ с интенсивностью свечения на два-четыре креста оценивается как положительный результат. При получении как положительных, так и отрицательных результатов иммунофлуоресцентных исследований мазков-отпечатков ставится предварительный диагноз. Окончательный диагноз ставится на основании результатов выделения и идентификации вируса в РПИФ в культуре ЛС (ККМС) (п.18.1.1.).

23.1.3. Выявление специфических антител в испытуемом материале в РПИФ оценивается как положительный предварительный диагноз. Для постановки окончательного диагноза необходимо проведение биопробы с последующей реизоляцией и идентификацией вируса в культуре ЛС (ККМС) в РПИФ или реакции гемадсорбции. При получении отрицательных результатов в РПИФ диагноз ставится на основании результатов выделения и идентификации вируса в культуре ЛС (ККМС) в РПИФ или реакцией гемадсорбции.

23.2. Классическая чума свиней.

23.2.1. Выделение вируса в культуре клеток РК-15, инокулированной испытуемым материалом, и идентификация его в РПИФ оценивается как положительный результат и ставится диагноз - классическая чума свиней. При получе-

нии отрицательных результатов после проведения двух последовательных пассажей испытуемого материала в культуре клеток РК-15 или биопробы на свиньях ставится отрицательный диагноз.

23.2.2. Обнаружение антигена вируса КЧС в мазках-отпечатках испытуемого материала в РПИФ с интенсивностью свечения на два-четыре креста оценивается как положительный диагноз.

При получении положительных или отрицательных результатов иммунофлуоресцентных исследований мазков-отпечатков диагноз ставится на основании результатов выделения и идентификации вируса в РПИФ в культуре клеток РК-15.

23.2.3. Выявление специфических антител в сыворотках проб крови невакцинированных против КЧС животных в РНИФ и РНФМ оценивается как положительный ретроспективный диагноз. При получении отрицательных результатов РНИФ и РНФМ диагноз ставится на основании результатов выделения и идентификации вируса в культуре клеток РК-15.

23.3. Болезнь Ауески

23.3.1. Выделение вируса в культуре клеток РК-15, инокулированной испытуемым материалом, идентификация его в РПИФ оценивается как положительный диагноз. При получении отрицательных результатов после проведения двух последовательных пассажей испытуемого материала в культуре клеток РК-15 или биопробы на кроликах ставится отрицательный диагноз.

23.3.2. Выявление специфических антител в сыворотках проб невакцинированных против БА свиней в РНИФ оценивается как положительный ретроспективный диагноз. При получении отрицательных результатов РНИФ диагноз ставится на основании результатов выделения и идентификации вируса в РПИФ в культуре клеток РК-15.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

24. При работе с компонентами набора следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с ветеринарными препаратами.

25. Все работы необходимо проводить с обязательным использованием средств индивидуальной защиты.

26. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

27. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии. Юридический и почтовый адрес - 601120, Владимирская область, г. Покров.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ.
Регистрационный номер ПВР- 1-5.7/01969