



**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ**

---

**Жануарлар**

**ВИРУСТЫҚ ДИАРЕЯНЫ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ**

**Животные**

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ**

**ҚР СТ 3501-2019**

*(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, NEQ)*

**Ресми басылым**

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің  
Техникалық реттеу және метрология комитеті  
(Мемстандарт)**



**Нұр-Сұлтан**

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3501-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





## ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

---

Жануарлар

**ВИРУСТЫҚ ДИАРЕЯНЫ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ**

**ҚР СТ 3501-2019**

*(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, NEQ)*

**Ресми басылым**

**Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігінің  
Техникалық реттеу және метрология комитеті  
(Мемстандарт)**

**Нұр-Сұлтан**



Алғысөз

**1 «Elit Art» ЖШС ДАЙЫНДАП ЕНГІЗДІ**

2 Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитеті Төрағасының 2019 жылғы 11 желтоқсандағы № 457-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП, ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

3 Осы стандарт ManualofDiagnosticTestsandVaccinesforterrestrialanimals (Жануарлар. Вирустық диареяны зертханалық диагностикалау әдістері. 3.4.7 тарау) Халықаралық эпизоотикалық бюро нұсқауын есепке ала отырып әзірленген

Сәйкестік дәрежесі – балама емес (NEQ).

Ағылшын тілінен (en) аударылған

4 Осы стандартта Қазақстан Республикасының «Стандарттау туралы» 2018 жылғы 5 қазандағы № 183-VI, «Ветеринария туралы» 2002 жылғы 10 шілдедегі № 339 Заңдарының ережелері іске асырылған.

**5 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ**

*Осы стандартқа енгізілетін өзгерістер туралы ақпарат жыл сайын басып шығарылатын «Стандарттау жөніндегі нормативтік құжаттар» ақпараттық каталогында, ал өзгерістер мен түзетулер мәтіні мерзімді басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтемелерінде жарияланады. Осы стандарт қайта қаралған (ауыстырылған) немесе жойылған жағдайда, тиісті хабарлама мерзімді басып шығарылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық сілтемесінде жарияланады*

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Сауда және интеграция министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде толықтай немесе бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды

## Кіріспе

Ірі қара малдың вирустық диареясы - ас қорыту жолының шырышты қабығының қабынуымен және зақымдануымен сипатталатын және ринит, безгек, диарея және кейде хромотамен көрінетін вирустық контагиозды ауру.

Ауру 2 жасқа дейінгі ірі қара малдарда жиі байқалады. Жас мал аэрогенді немесе алиментарлық жолмен жұқтыруға бейім. Вирус өну патология тудыра отырып, интраплаценталық және ұрық арқылы берілуі мүмкін. Ауру жасырын (белгілерсіз) өтуі немесе өліммен аяқталатын асқынуларға әкелуі мүмкін. Аурудың клиникалық көріністері мен ауырлығы вирус штаммына байланысты әр түрлі болады. Вирусты диарея сондай-ақ иммунитетті түсіреді, бұдан инфекцияланған жануарлардың басқа вирустар мен бактерияларды жұқтыруға сезімталдығы артады. Клиникалық әсер көбінесе төлдеу деңгейі жоғары мал шаруашылығы фермаларында кездеседі. Буаздылығы бойынша бірінші триместрде құрсақішілік инфекцияға ұшыраған жануарлар әрдайым созылмалы инфекцияланған (СИ) болып табылады. СИ жануарлар популяциядағы вирустың негізгі көлемін қамтамасыз етеді және вирустың көп бөлігін несеппен, нәжіспен, басқа бөліністермен, сүтпен және ұрықпен шығарады. Вирус негізінен СИ жануарлар мен басқа мал арасында тығыз байланыста болады. Вирусты жіті жұқтырылған жануарлардың бөлінуінен әдетте елеулі зардап болмайды. Осы вирус қоршаған ортада қысқа уақыт кезеңінде сақталады немесе ластанған репродуктивті материалдармен беріледі. Тік берілу осы аурудың эпизоотологиясы мен патогенезінде маңызды рөл атқарады.

Вирусты диарея қоздырғышы дегеніміз - Flaviridae тұқымдас Pestivirus тектес жалғыз желілік-позитивті РНК вирусы. Тек құрамында вирустың екі генотипі (1 және 2-типтері) және шошқаның классикалық обасы мен қойдың шекті ауруының жақын тектес вирустарын қоса алғанда, түрлерінің қатары болады. Осы генотиптерде вирустар бір-бірінен айтарлықтай антигендік айырмашылықты көрсетеді және 1 және 2-типті вирустың изоляты шегінде айтарлықтай биологиялық және антигендік әртүрлілікті көрсетеді. Генотиптердің екі дерегінің ішінде генетикалық талдау көмегімен басқа да түрлерін бөліп көрсетуге болады. Екі генотипті бір-бірінен және басқа да пестивирустардан негізгі гликопротеиндерге қарсы бағытталған моноклонды антиденелердің көмегімен немесе генетикалық талдаумен дифференциялауға болады. Полимеразалық тізбек реакция кері транскрипциямен (КТ-ПТР) вирусты тікелей қан үлгілерінен жіктеуге мүмкіндік береді.

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3501-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





## ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

## Жануарлар

## ВИРУСТЫҚ ДИАРЕЯНЫ ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУ ӘДІСТЕРІ

Енгізілген күні 2020-07-01

**1 Қолданылу саласы**

Осы стандарт мүйізді ірі қара малдың мынадай вирустық диареясын зертханалық диагностикалау әдістерін анықтайды:

- ПТР әдісі;
- серологиялық әдістер (ИФА, РН);
- иммуногисто-химиялық әдіс;
- вирусологиялық әдістер.

**2 Белгіленулер мен қысқарған сөздер**

**1-октилбета-D-глюкопиранозид; ОГП**

**Иммуноглобулин; IgG**

**Дезоксирибонуклеин қышқылы; ДНК**

**Иммуногистохимиялық әдіс; ИГХ**

**Имуноферменттік талдау; ИФА**

**Ірі қара мал; ІҚМ**

**Моноклоналды антидене; МАт**

**Микромоль; мкМ**

**Микролитр; мкл**

**Моль; М**

**Миллиграмм; мг**

**Бейматрицалық бақылау; НМК**

**Нуклеин қышқылы; НК**

**Кері бақылау; КБ**

**Кері транскрипциялы полимеразды тізбекті реакция; КТ-ПТР**

**Полимеразды тізбекті реакция; ПТР**

**Оң бақылау; ПК**

**Шектік цикл; Ct**

**Вирустық диарея; ВД**

**Рибонуклеин реакциясы; РНК**

**Бейтараптандыру реакциясы; РН**

**Тасымалы рибонуклеинді қышқыл; тРНК**

**Фосфатты-тұзды буфер; ФТБ**

**Твині бар фосфатты-тұзды буфер; ТФТБ**

**Созылмалы инфекция; СИ**

**Жұмыртқаның созылмалы инфекциясы; ЖСИ**

**Цитопатогенді эффект; ЦПЭ**

**Цитопатогенді үлес; ЦПД**

**Этилен-Диамин-Тетрасірке Қышқылы; ЭДТК**



## ҚР СТ 3501-2019

### 3 Жалпы ережелер

Вирустық диареяның зертханалық диагностикасы қан мен тіндерде вирусты антигендерді немесе вирусты РНК анықтауға бағытталған әдістермен жүргізіледі.

Вирус сондай-ақ екпелерде вирустың репликациясын бөліп алу үшін қабылдағыш жасушалық екпелерге кейіннен иммунизациялау арқылы іріктелген үлгілерді инокуляциялау жолымен бөлінуі мүмкін.

### 4 Сынамаларды іріктеу және дайындау

#### 4.1 Жіті инфекция

4.1.1 Жіті инфекциясы бар жануарлар қысқа уақыт кезеңінде (7 күннен 10 күнге дейін) вирустың салыстырмалы түрде төмен мөлшерін бөледі. Бұл ретте клиникалық белгілер вирустың неғұрлым кеш сатыларында көрінуі мүмкін, бұл вирусты анықтау үшін уақыттың қысқаруына әкеледі.

Аурудың респираторлық немесе ішек түрлері кезінде сынамалар зақымданған жануарлар тобынан, көбіне жақын арада ауру жұқтырған дарақтардан алынуға тиіс. Жағындыларды мұрын шырышынан және тыныс алу жолдарының зақымдану белгілері бар жануарлардың конъюнктиваларынан жинау керек. Асқазан-ішек жолдарының зақымдану белгілері болған жағдайда сынамалар тік ішек пен нәжістен алынады.

Өкпе мен көкбауырдың сынамаларын өлген жануарлардан алады.

Вирустық РНК нақты уақыттағы кері транскрипциясы бар (КТ-ПТР) полимеразды тізбекті реакция әдісі арқылы анықталуы мүмкін. Бұл әдіс жоғары сезімталдыққа ие және инфекциялық емес вирустық бөлшектер генімен анықтауға мүмкіндік береді.

Серологиялық зерттеулер жүргізу инфекцияның болуын анықтау немесе болдырмау мүмкіндігін береді. Осы әдіс кезінде жануарлардан алынған қан сарысуын ауру ағымының жіті түрінде және сауығатын жануарлардан жұптап зерттейді (8-10 жануардан жіті түрден кейін 21 күн өткен соң).

4.1.2 Аборт, өлі туу немесе ерте өлімнің вирусты диареядан туындайтынын растау қиындық келтіреді, себебі инфекцияның басталуы, өлім немесе аборт арасында елеулі уақыт өтуі мүмкін. Сынамаларды алу кезінде вирустық компоненттер немесе антиденелер сынамаларының нені анықтауға арналғанын ескеру керек.

Көкбауыр және өкпе вирусты анықтау үшін алынады. Үлпершек немесе өкпекап сұйықтықтары серологиялық зерттеулер жүргізу үшін алынады. Жаңа туған бұзаулардың асқазанын емудің болмағанын растау үшін тексереді. Кейбір жағдайларда вирус ұрықтың тінінен бөлінуі мүмкін, ИФТ көмегімен вирусты антигенді анықтауға немесе нақты уақыттағы КТ-ПТР көмегімен вирусты РНК-ны анықтауға ерекше назар аудару керек.

Серологиялық зерттеулер ИФТ әдістерімен және вирусты бейтараптандыру реакциясымен жүргізіледі. Бұл ретте сынамалардың сапасы мен бактериялық ластану деңгейі вирусты бейтараптандыру реакциясын қою сапасына әсер етеді.

#### 4.2 Созылмалы инфекциялар

Салыстырмалы жоғары сезімталдыққа ие ИФТ және КТ-ПТР тірі және өлген жануарларда вирусты антигендерді немесе РНК-ны анықтау үшін кеңінен қолданылады.

Сондай-ақ қандағы цитопатиялық емес вирусты анықтауға бағытталған вирустың бөлінуі пайдаланылады, дегенмен кейбір елдерде вирус иммундық гистохимиялық әдіспен (ИГХ) сәйкестендірілген. 4-5 айға дейінгі бұзаулардың қанынан вирустың бөлінуі ІҚМВД вирусына аналық антидененің қатысуымен бұзылуы мүмкін. Созылмалы вирустың бар



ересек жануарларда олардың антигендік түрде созылмалы вирустан ерекшеленетін вирустың штамдарына (вакциналарды қоса алғанда) сероконверсиясына қабілеттілігіне байланысты антиденелер деңгейінің төмендігі байқалады. Сүттің сынамаларын жаппай (резервуар) немесе жеке іріктеу сауын мал табында жануарлардың СИ болуына мониторинг жүргізу үшін пайдаланылады. Вирусты бөлу үшін антигенге ИФТ, сондай-ақ КТ-ПТР сияқты диагностикалау әдістері қолданылады. Созылмалы инфекция диагнозын растау үшін жануарларды кем дегенде 3 аптадан кейін қан үлгілерін вирустың және сероконверсия белгілерінің болуына сынау жолымен зерттеу қажет. Кейбір жіті жағдайларда вирусты антигеннің теріде бірнеше апта бойы сақталуы мүмкін болғандықтан, тері үлгілерін қайта зерттеген кезде сақ болу керек.

#### **4.3 Шырышты қабықтардың зақымдануы**

Шырышты қабықтардың зақымдану диагнозын зертханалық растау үшін цитопатиялық вирусты оқшаулау қажет. Бұл биотип кейде қаннан бөлінуі мүмкін, бірақ көптеген басқа тіндерден, атап айтқанда көкбауырдан, ішектен және пейер шытырасынан барынша тізбектеліп қалпына келтірілуі мүмкін. Вирусты оқшаулау оңай алынатын және жасушалық өсірінділер үшін уыттылығы аз болатын көкбауырдан оңай жүзеге асырылады.

#### **4.4. Репродуктивті материал**

Донор бұқалардың шәуеті шәуетті жинағанға дейін инфекцияның болуын зерттеу үшін алынуға тиіс. Бұқалардың СИ емес екенін, жіті инфекцияға ұшырамағанын растау қажет, сондай-ақ олардың серологиялық мәртебесін анықтау керек. Алғашқыда жаңа алынған қанның немесе сарысудың сынамаларына зерттеу жүргізу қажет. Серопозитивті бұқада ата бездің созылмалы инфекциясының (АСИ) болмауын анықтау үшін вирустың төменгі деңгейде, әсіресе жұқтырудың ерте сатысында үзік-үзік бөлінуі мүмкін болғандықтан, шәует сынамасын кемінде 7 күн аралықпен кемінде үш рет алу керек. Сондай-ақ әрбір жинаудан шыны түтіктердің аздаған көлемін немесе жаңа алынған шәуеттің тиісті көлемін алу қажет.

### **5 Диагностикалау әдістері**



ҚР СТ 3501-2019

1-кесте – Ірі қара малдың вирустық диареясын диагностикалау әдістері және олардың мақсаты

Әдіс	Мақсаты					
	Инфекциядан бос популяция	Олардың қозғалысына дейін инфекциядан бос жеке жануарлар	Жою саясатына жәрдемдесу	Клиникалық жағдайларды растау	Инфекцияның таралуы - бақылау	Вакцинациядан кейін жеке жануарлардың не популяциялардың иммундық мәртебесі
Агентті табу <sup>1</sup>						
Вирусты оқшаулау	+	+++	++	+++	-	-
ИФТ әдісімен антигенді анықтау	++	+++	+++	+++	+++	-
Бір үлгіге вирусты анықтаудың бірнеше әртүрлі әдістерін қолдану ұсынылады						
Әдіс	Мақсаты					
	инфекциядан бос популяция	Олардың қозғалысына дейін инфекциядан бос жеке жануарлар	Жою саясатына жәрдемдесу	Клиникалық жағдайларды растау	Инфекцияның таралуы - бақылау	Вакцинациядан кейін жеке жануарлардың не популяциялардың иммундық мәртебесі
Антигенді ИГХ әдісімен анықтау	-	-	-	++	-	-
ПТР әдісімен НҚ анықтау	+++	+++	+++	+++	+++	-
Иммундық жүйенің реакциясын анықтау						
ИФТ	+++	++	+++	-	+++	+++
БР	+	+++	++	-	+	+++
<p>+++ = Ұсынылатын әдіс;                      ++ = Қолайлы әдіс;                      + = Кейбір жағдайларда пайдаланылуы мүмкін, бірақ құны, сенімділігі немесе басқа да факторлар оның қолданылуын айтарлықтай шектейді;                      - = Бұл мақсатқа сәйкес келмейді.</p> <p>ПТР = полимераздық тізбекті реакция;                      БР = вирусты бейтараптандыру реакциясы;                      ИГХ = иммундық гистохимиялық әдіс;                      ИФТ = иммуноферменттік талдау.                      НҚ – нуклеин қышқылдары</p>						

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОЛУМРВЕТ"  
 СТ РК 3501-2019 ырдан РГП на ПВХ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан

## 6 Агентті сәйкестендіру

**6.1** Ірі кара малдың вирусты диареясын жұқтырған жануарларды немесе жануарлар дериваттарын (әсіресе шәуеті мен эмбриондарын) сатуды болдырмау үшін жөнелтілетін жануардың немесе генетикалық материал донорының (шәует немесе эмбриондар) қанында инфекциялық вирустың (вирустың бөлінуі), вирустық антигендердің (ИФТ әдісімен антигеннің табылуы) немесе РНК (нақты уақыт режимінде КТ-ПТР) болуын тексеру қажет. Шәуеті тексерілуге тиіс серопозитивті бұқалар бұған жатпайды. Серологиялық зерттеулер серонегативті жануарларда жіті инфекцияның болмауын растау үшін немесе донор бұқалардың серологиялық мәртебесін анықтау үшін маңызды әдіс болып табылады. ИГХ немесе тікелей тіндерде алдын ала вирустық амплификациясыз гибридизация сияқты процедуралар олардың ауыспалы сезімталдығына байланысты халықаралық сауда үшін ВД-дан қорғау үшін жеткілікті кепілдік бермейді. Иммундық бояу негізінен далалық инфекцияларда кездесетін ВД-ның цитопатиялық емес штамдарының болуын анықтау үшін жасушалық өсірінділерде вирустың бөлінуінің маңызды компоненті болып табылады.

**6.2** Барлық әдістер виремия деңгейі төмен және жоғары дарақтарды қоса алғанда, ірі кара малдың белгілі инфекцияланбаған және инфекцияланған популяцияларында тестілеу жолымен мұқият валидациялануға тиіс. Поликлонды немесе МАТ-байланыстыратын талдауларға (ИФТ немесе ИГХ), иммундық белгіге (ИБ) немесе нуклеин қышқылдарын (ПТР) тануға негізделген әдістердің ВД вирустары арасында анықталған антигендік және генетикалық әртүрліліктің толық спектрін анықтайтыны дәлелденуге тиіс.

## 6.3 Вирусты оқшаулау

**6.3.1** Жоғары стандарттарға сәйкес орындаған кезде ВД қоздырғышын оқшаулау өте сенімді. Дегенмен, жасушалық өсірінділер мен орта компоненттерінің ВД-ның не вирустың спецификалық антиденелері деңгейінің төмен болуымен сезімталдығы жоғары және қауіпке ұшырамайтын жүйені құруды қамтамасыз етуге арналған өте қатаң талаптары бар. Вирусты оқшаулау инфекциялық вирусты анықтауға мүмкіндік береді, бұл сынаманың сапасына белгілі бір шектеулер қояды. Бұдан басқа кейбір сынамаларда, әсіресе шәуетте болуы мүмкін вирустың төменгі деңгейін анықтау үшін сынамалардың әлдеқайда үлкен көлемін зерттеу қажет болуы мүмкін. Осы шектеулердің кейбірін дәлелденген жоғары аналитикалық сезімталдығы бар антигендерді анықтау үшін ИФТ арқылы немесе нақты уақыттағы КТ-ПТР арқылы еңсеруге болады.

**6.3.2** Вирус ірі кара малдың бір қабатты жасушалық өсірінділерінде (мысалы, бүйрек, өкпе, ата без немесе мұрын қуысы) бөлінуі мүмкін. Кейбір жағдайларда қойлардың жасушалық өсірінділері да қолайлы. Сұйық азотта жасушалық суспензия түрінде бастапқы немесе қайталама өсірінділерді мұздатуға жол беріледі. Содан кейін олар пассаждар сериясына тексеріледі немесе әдеттегі пайдалану алдында бекітілген жасушалар партиясымен салыстырғанда ластанудың болмауын тексеру және олардың сезімталдығын бағалау үшін басқа қабылдағыш жасушаларға себіледі. Мұндай процедураларды пайдалану ІҚМВД-дан еркін жануарлардан алынған үздіксіз жасушалық желілерді пайдалану кезінде төмендейді, бірақ олардың ІҚМВД-дан еркіндік мәртебесі және олардың қабылдағыштығы үнемі бақыланып отыруға тиіс. Үздіксіз жасушалық желілер «себу партиясы» жүйесінде қолданылуға тиіс, онда олар тек пассаждың шектеулі диапазонында ғана пайдаланылады, оның шегінде олар ІҚМВД инфекциясына қолайлы сезімталдықты көрсетуге тиіс. Әртүрлі өту тарихына байланысты әртүрлі көздерден алынған жасушалық өсірінділерде айырмашылықтар болуы мүмкін екенін ескеру керек, сондықтан әдеттегі пайдалану алдында олардың жарамдылығы қосымша расталады.

## ҚР СТ 3501-2019

6.3.3 ВД-ның цитиопатиялық емес вирусы ірі қара мал тіндерінің кең таралған лаस्ताушысы болып табылады, сондықтан жасушалық өсірінділер жүйелі тестілеу арқылы вирустың жанама тұқымдануының болмауы тұрғысынан тексерілуге тиіс. Жасушалар жасушаларды өсіруге арналған тексерілген ортада өсірілуге тиіс және жасушалардың үлкен ауданы зерттелуге тиіс. 96-ұяшықты планшеттің бірнеше ұяшығын тексеру жеткілікті емес, 96-ұяшықты планшеттің барлық ұяшығын зерттеу керек. Жасушалық өсіріндіде пайдалану үшін іріктеп алынған фетальды бұқа сарысуы тек вирустан ғана емес, сонымен қатар ІҚМ ВД бейтараптандыратын антиденесінен де бос болуға тиіс. Ластанған сарысуда ВД вирусының бұзылуы үшін термиялық өңдеу (30-45 минут ішінде 56°C) жеткіліксіз; кемінде 25 кГр (2,5 Мрад) дозамен сәулелендіру неғұрлым тиімді болып табылады. Донорларды вирустарға да, антиденелерге де тестілеу әрбір дарақ үшін жеке жүзеге асырылады.

6.3.4 Лейкоциттердің ашық қабаты, жаңа алынған қан, жуылған лейкоциттер немесе сарысу вирусты тірі дарақтардан бөліп алу үшін жарамды. Аналық антиденелер жас бұзаулар сарысуынан вирусты анықтауға кедергі келтіреді. Өлген дарақтардың тіндерінен суспензияларды стандартты әдістермен дайындау керек. ІҚМ-ның ІҚМ ВД СИ емес екенін растау қан сынамаларын зерттеу арқылы жүзеге асырылады. Дегенмен бұрын жіті инфекциядан кейінгі ата бездің созылмалы инфекциясы анықталған, бірақ одан кейін инфекциялық болып табылмайтын кейбір бұқалар серопозитивті болып табылады. Вирус осындай бұқалардың шәуетінің көптеген сынамаларында анықталуы мүмкін. АСИ-ді жоққа шығару үшін барлық серопозитивті бұқалардың шәуетін зерттеу керек. Бірнеше апта ішінде іріктеп алынған шәует сынамалары бұқаларда АСИ-дің жоқ екенін растау үшін зерттелуге тиіс. Сынамаларды тексергеннен кейін серопозитивті бұқаның шәуетін одан әрі тестілеу жүргізілмейді. Жаңа алынған шәует, сондай-ақ құрамында көптеген басқа элементтер бар шәует цитоуытты және тиісті өсірінділік ортада өсірілуге тиіс. Осыған байланысты инкубация кезінде аралықтармен микроскопиялық зерттеу арқылы жасушалардың жағдайын бақылауды жүзеге асыру қажет.

6.3.5. Стандартты вирустық препаратты табудың барынша сезімталдығын қамтамасыз ету мақсатында барлығы оңтайландырылуға тиіс. Жасушалық өсірінділер үшін пайдаланылатын барлық биологиялық компоненттер вирустың және ІҚМВД антиденелерінің жоқтығын растай отырып, скрининг арқылы тестіленуге тиіс. Жасушалардың өсінділері (бастапқы және үздіксіз желілер) вирустық инфекцияға барынша сезімталдықты қолдауды растау үшін үнемі тестіленіп отырады. Үлгінің типіне және тестілеу мақсатына байланысты вирусты бөлу үшін жасушалық өсірінділерде бір немесе бірнеше пассаж қажет болады. Жануарлардың ХИ-ын бір пассаж үшін қан немесе сарысуды скринингтеу жолымен сәйкестендіру керек. Шәуетті үш пассаж ішінде және фетальды бұқа сарысуы сияқты биологиялық өнімдерді бес ретке дейін үнемі өсіру керек (бастапқы инокуляция плюс төрт пассаж). Вирусты бөлудің әдеттегі тәсілдері цитопатиялық вирустың өсуін анықтау үшін иммундық бояудың соңғы сатысын (иммунофлуоресценция немесе көбіне пероксидазала бояу) қосу арқылы пайдаланылады. Осылайша шыны түтіктердегі өсірінділер жабын шыныларды қамтуға тиіс, ал микропланшеттердегі өсірінділер тікелей планшетте бекітілуі және таңбалануы мүмкін. Соңғы пассаждан алынған өсірінділік супернатант (шөгінді үсті сұйықтығы) нақты уақыттағы ОТ-ПТР арқылы скринингтен өткізілуі мүмкін.

## 6.4 Жаппай скрининг кезінде сарысудың сынамаларында вирустарды анықтауға арналған микропланшеттік иммундық пероксидаза әдісі

### 6.4.1 Аппаратура, материалдар, реактивтер

- Микротитрациялық планшеттер (96-ойық)
- Көпарналы мөлшерлегіштер, бір арналы мөлшерлегіштер, зарарсыз пластик

ұштықтар

- Жасушалық желі паспортына сәйкес жасушыларды өсіруге арналған орта  
- Вирустық зертханаға арналған стандартты зертханалық жабдық (зарарсыздандырылған жұмыс үстелі, инвертирленген микроскоп, СО<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С), үйірткі, термиялық үйірткі (80 °С), тоңазытқыш, мұздатқыш камера (минус 20 °С, минус 70 °С)

- Полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат 80 (TWEEN 80) (ФТБТ) және 5% жылқы сарысуы

- Формальдегид
- Полисорбат 20 (Tween 20) 0,05 % су ерітіндісі
- 1%-м желатин
- 3-амин-9-этилкарбазол
- ацетон
- дистилденген су
- диаминобензидин тетрагидрохлориді, натрий пербораты тетрагидраты

#### 6.4.2 Тест жүргізу процедурасы

а) 10-25 мкл. сарысудың сынамаларын тіндер өсірінділеріне арналған 96-ұяшықты микропланшеттің әрбір төрт ұяшығына салады. Бұл рәсім әрбір сынама үшін қайталанады. Белгілі оң және теріс бақылаулар қосылады.

б) Фетальды сарысусыз ортада тиісті концентрациядағы (әдетте 150000 жасуша / мл жуық) 100 мкл. жасушалық суспензия барлық ұяшықтарға қосылады.

Ескертпе: сынаманың өзі жасушалардың өсуі үшін қоспа ретінде әрекет етеді.

Сарысудан басқа үлгілерді тестілеу кезінде күйіс қайыратын жануарлардың пестивирустарына антиденелері жоқ 10% фетальды бұқа сарысуы болатын орта пайдаланылады.

в) Планшет 37°С-та 4 күн бойы немесе 5% СО<sub>2</sub> атмосферада немесе жабық пластинамен инкубацияланады.

г) Әрбір ұяшық цитопатология белгілерінің (цитопатиялық әсердің) немесе цитоциттылық белгілерінің болуына микроскоппен зерттеледі.

д) Өсірінділерді қысқа уақытқа 80°С-та температурада мұздатады және 50 мкл. өсірінділік супернатантты (шөгінді үсті сұйықтығы) 1 - 4 қадамдарды қайталай отырып, жаңа жасушалық өсірінділерге ауыстырады.

е) Содан кейін жасушалар екі келесі тәсілдердің бірімен бекітіледі және боялады:

1) Формальдегидпен

а) Планшетке 1/10 пропорцияда ерітілген формальдегид ерітіндісінің (шамамен 3% концентрациясы) 200 мкл қосылады және планшет бөлме температурасында 10 минутқа қалдырылады.

б) Планшеттің ішіндегісі жойылады, ал планшеттің өзі жуылады.

в) Планшет 5 рет Полисорбат20 (Tween 20) 0,05% сулы ерітіндісімен жуылады.

г) Әрбір ұяшыққа тиісті сұйылтылған (құрамында 1% желатин бар фосфатты-тұзды буферде (ФТБ) дайындалған) вирусқа қарсы антиденелердің 50 мкл енгізіледі және ылғалданған камерада 37°С-та 60-90 минут бойы инкубацияланады.

д) Пластиналар осы тармақтың в) тармақшасында көрсетілгендей бес рет жуылады.

е) 1% желатин/ФТБ-да оңтайлы ерітілгенге дейін пероксидазамен тиісті конъюгацияланған антисарысу (мысалы, пероксидаза, вирусқа қарсы антидене тышқанда моноклонды болған кезде тышқанға қарсы қоян иммуноглобулиндерімен конъюгацияланған пероксидаза) сұйылтылады. Оңтайлы концентрацияны конъюгаттың әрбір партиясы үшін оң және теріс бақылау үлгілеріне қатысты «шахматтық» титрлеу жолымен анықтау керек.

ж) Микропланшеттің әрбір ұяшығына 50 мкл сұйылтылған конъюгатапероксидаза





## ҚР СТ 3501-2019

қосылады және ылғалды камерада 37°C-та 90 минут бойы инкубацияланады.

и) Пластиналар осы тармақтың в) тармақшасында көрсетілгендей бес рет жуылады.

к) 3-амин-9-этилкарбазол субстраты қосылған планшет (ұяшыққа 100 мкл.) және 20 °С-тан 23 °С дейін температурада 30 минут бойы бөлме температурасында экспозициялар «әзірленеді».

л) Әрбір ұяшыққа 100 мкл ФТБ қосылады және әрбір планшет қақпақпен жабылады.

к) Ұяшықтар теріс және оң бақылау үлгілері бар ұяшықтардан бастап жарық микроскоптың көмегімен тексеріледі. Инфекцияланбаған жасушаларда көзге көрінетін немесе барынша аз бояу (теріс бақылау) болмауға тиіс. Инфекцияланған жасушалар (оң бақылау) цитоплазмада қызыл-қоңыр түсте болуға тиіс.

2) Ацетонмен

а) Планшет бірқалыпты айналдыру және ішіндегісін фосфатты-тұзды буферде (ФТБ) жуу арқылы босатылады.

б) Жасушалар мынадай түрде бекітіледі: планшет ФТБ-да ацетонның 20% ерітіндісі бар ваннаға салынады, бірден босатылады және одан кейін ФТБ-да ацетонның 20% ерітіндісі бар жаңа ваннаға 10 минутқа ауыстырылады. Планшеттің ішіндегісі мұқият төгіледі және барлық сұйықтық үрлеу және шаю жолымен шығарылады. Пластина 25-тен 30°C дейін температурада 3 сағат бойы мұқият кептіріледі (мысалы, қабырға шамының жылуын пайдалану арқылы).

Ескертпе: кептіру бекіту процесінің бір бөлігі болып табылады.

в) Бекітілген жасушалар ФТБ-ны барлық ұяшықтарға қосу жолымен жуылады.

г) Ұяшықтар төгіледі және барлық ұяшықтарға ФТБ-да 1% Полисорбат 80 (TWEEN 80) (ФТБТ) алдын ала сұйылтылған ВД антиденелері (50 мкл.) және 5% жылқы сарысуы немесе 1% желатин қосылады. (Жылқы сарысуы немесе желатин спецификалық емес бояуды азайту үшін қосылуы мүмкін).

д) Препарат 37°C-та 15 минут бойы инкубацияланады.

е) Планшет ішіндегісі босатылады және ФТБ-да үш рет жуылады.

ж) Төгіледі және 37°C-та 15 минут бойы ФТБТ-да (50 мкл.) алдын ала анықталған сұйылтылған пероксидазамен конъюгацияланған тиісті антигүрлік сарысу қосылады.

и) Планшет босатылады және ФТБТ-да үш рет жуылады.

к) Планшет тазартылған суда шайылады. Барлық сұйықтық планшеттен ағып кетуге тиіс.

л) Тиісті хромоген, 3-амин-9-этилкарбазол бар сутегі тотығының жаңа дайындалған субстраты қосылады. 15 мл ФТБ-да ерітілген, 9 мг тетрагидрохлорид диаминобензидиннен және 6 мг натрий пербораты тетрагидратынан тұратын альтернативті субстратты дайындауға жол беріледі.

м) Планшет микроскоппен зерттеледі. Вирусозитивті жасушалар қызыл-қоңыр цитоплазмалық бояуды көрсетеді. Жылуды пайдалануды қамтитын жасушаларды бетітудің балама әдістерін пайдалануға жол беріледі. Вирусты антигенді анықтау қабілеті бұзылмағанына көз жеткізу үшін оларды ең алдымен зерделеу керек.

### 6.5 Тіндерді немесе жасушалар өсінділерінің суспензияларын зерттеуге арналған шыны түтіктегі әдіс

6.5.1 Бұл әдіс 24-сәулелі тілімшелер үшін де бейімделуі мүмкін. Кемі 2, ал дұрысы 3 пассаж (бастапқы инокуляцияны қоса алғанда) қажет.

6.5.2 Аппаратура, материалдар, реактивтер

- Көп арналы мөлшерлеуіштер, бір арналы мөлшерлеуіштер, стерильді пластикалық ұштықтар

- Сезімтал жасушалы өсінділер

- Жасушаларды өсіруге арналған орта жасушалық желі паспортына сәйкес
- Вирустық зертханаға арналған стандартты зертханалық жабдық (зарарсыздандырылған жұмыс үстелі, инвертирленген микроскоп, СО<sub>2</sub>-инкубатор (37° С), үйірткі, термоүйірткі (80 °С), тоңазытқыш, мұздатқыш камера (минус 20 °С, минус 70 °С).
- Сынауықтар
- Жабын шынылары
- Ацетон

#### 6.5.3 Тестті жүргізу процедурасы

1) Тіндердің сынамалары өсірінділік ортада 10% суспензия алу арқылы ұсақталады. Содан кейін қоқысты шығару үшін үйірткілейді.

2) ІҚМ қабылдағыш жасушаларының жаңа конфлюэнтті немесе субконфлюэнтті моноқабаттары бар шыны түтіктердегі өсірінділер 0,1 мл сынамада инокуляциялайды. Жасушалар өсіріндісін 37°С-та 1 сағатқа адсорбциялануға қалдырылады.

3) Өсірінді 1 мл ортада жуылады; содан кейін төгіледі және 1 мл өсірінділік сүйемелдеу ортасы қосылады.

4) Өсірінді 37°С-та 4-5 күн бойы инкубацияланады және ЦПЭ немесе цитоуыттылық белгілерінің болуына микроскоппен зерттеледі.

5) Содан кейін бір-екі және одан да көп пассаж үшін (түпкілікті иммундық бояу үшін инокуляцияланған өсірінділерді қоса алғанда) жасушалардың жаңа өсінділеріне пассаждау үшін өсірінді мұздатылады және ерітіледі. Соңғы пассаж кезінде мұздатып, ерітілгеннен кейін тіннің өсірінділік сұйықтығы жиналады және иммундық пероксидаза әдісімен немесе иммундық флуоресцентті әдіспен өсіру және бояу үшін микротитрлеу плашкаларына ауыстырылады. Иммундық флуоресценция үшін шыны түтіктердегі жабын шынылары өсірілетін жасушаларды сүйемелдеу үшін пайдаланылады. Өсіру кезеңінің соңында жабын шынылары алынып тасталады, 100% ацетонда бекітіледі және ВД-ға иммундық флуоресцентті конъюгатпен боялады. Жабын шынылары флуоресцентті микроскоппен пестивирустарға тән диффузды, цитоплазмалық флуоресценция тұрғысынан тексеріледі. Балама түрде соңғы пассаждан алынған өсірінділік супернатант нақты уақыттағы КТ-ПТР арқылы скринингтен өткізілуі мүмкін.

### 6.6 Шәует сұйықтығынан вирустың бөлінуі

6.6.1 Зерттеу үшін пайдаланылатын сынамалар сұйылтылған бұқа шәуеті немесе жаңа алынған шәует болып табылады. Шәует сынамалары зертханаға сұйық азотта немесе құрғақ мұзда тасымалданады. Сынамалар сұйық азотта немесе -70°С-тан төмен температурада (ұзақ сақтау үшін) не +4 ° С-та (қысқа мерзімге сақтау үшін 12 күннен артық емес) сақталады. Алушы зертхана үлгілерді алу шарттарын құжаттамалау керек. Жаңа алынған шәует уытты және алдын ала жасушалық өсірінділерге қосу алдында сұйылтылған болуға тиіс (мысалы, ІҚМ ВД жоқ ІҚМ сарысуының 1/10-да). Кемінде 0,1 мл жаңа алынған шәует жасушалар өсіріндісінде үш пассажбен тексеріледі. Сұйылтылған шәуетті дайындау 0,1 мл-ден кем емес өңделмеген шәуетке балама зерттеуге кепілдік беруге тиіс (мысалы, кемінде 1,0 мл сұйылтылған шәует). Уыттылық анықталған кезде 0,1 мл жаңа алынған шәуетке балама көлемге жету үшін бірнеше сұйылтылған сынаманы тестілеу қажет етіледі (мысалы, уыттылықты төмендету үшін 1/5 арақатынасында сұйылтылған шәуеттің 5 × 1 мл. сынамасы).

#### 6.6.2 Аппаратура, материалдар, реактивтер

- Көп арналы мөлшерлеуіштер, бір арналы мөлшерлеуіштер, стерильді пластикалық ұштықтар
- Сезімтал жасушалы өсінділер
- Жасушаларды өсіруге арналған орта жасушалық желі паспортына сәйкес

## ҚР СТ 3501-2019

- Вирустық зертханаға арналған стандартты зертханалық жабдық (зарарсыздандырылған жұмыс үстелі, инвертирленген микроскоп, СО<sub>2</sub>-инкубатор (37° С), үйірткі, термиялық үйірткі (80 °С), тоңазытқыш, мұздатқыш камера (минус 20° С, минус 70° С).

- Жасуша өсінділеріне арналған сынауықтар, алты ұяшықты планшет

- Антибиотиктерден тұратын, ІҚМ сарысуы

### 6.6.3 Тест жүргізу процедурасы

Ұсынылатын әдіс мынадай:

а) 200 мкл жаңа алынған шәует құрамында антибиотиктер бар 1,8 мл ІҚМ сарысуында сұйылтылады. Жасушалық өсірінділерге қосымша ретінде пайдаланылатын сарысуды ВД вирусына қарсы антиденелердің жоқтығын растай отырып, пайдалануға жол беріледі.

б) Қарқынды араластырылады және 20 °С-тан 23 °С дейін температурада 30 минутқа қалдырылады.

в) 1 мл шәует/сарысу қоспаларын жасушаларды өсіруге арналған шыны түтіктерге сезімтал жасушалардың моноқабатына немесе тіндерді өсіруге арналған алты ұяшықты планшетке инокуляциялайды.

г) Өсірінділер 37°С-та 1 сағат бойы инкубацияланады.

д) Қоспаны алып тастайды, моноқабат сүйемелдеу ортасымен бірнеше рет жуылады, содан кейін өсірінділерге жаңа сүйемелдеу ортасы қосылады.

е) Тесттегі ВД-ның теріс және оң бақылауы қосылады. Сыналатын ұяшықтардың оң бақылау үлгісімен кездейсоқ ластануына жол бермеу үшін ерекше сақ болу керек. Оң бақылау үлгісі әрқашан соңынан енгізіледі.

ж) Ластанудың және цитоуыттылықтың болмауын қамтамасыз ету үшін планшеттерді микроскопиялық бақылау жүзеге асырылады. ВД инфекциясының нәтижесінде цитопатология күтілмейді, бірақ ІҚМ герпес вирусы (ВНВ-1) сияқты басқа вирустар әдейі емес бөлінуі мүмкін.

и) 5-7 күннен кейін өсірінділер шамамен -70°С-та немесе одан төмен температурада мұздатылады және ерітіледі, үйірткілеу арқылы ағартылады, ал супернатант жаңа моноқабаттардың инокуляциясы үшін пайдаланылады.

к) Екінші пассаждың соңында мұздату-еріту арқылы препараттан алынған супернатант иммундық пероксидазамен бояу немесе егілгеннен соң 5 күннен кейін нақты уақыттағы КТ-ПТР арқылы басқа антигенді анықтау үшін қолайлы жүйедегі өсірінділерге пассаждалады. Бұл процедураны 96-ұяшықты микропланшеттерде жүзеге асырған тиімді. Егер вирусты антиген немесе ВД РНК белгілері анықталмаса, сынама теріс деп есептеледі.

## 6.7 Нуклеин қышқылын анықтау

6.7.1 Гель негізіндегі дәстүрлі КТ-ПТР диагностикалық мақсатта ВД РНК вирусын анықтау үшін қолданылады. Мультиплексті КТ-ПТР жасушалық өсіріндіден немесе тікелей қан сынамаларынан вирусты бір мезгілде амплификациялау және типтеу үшін пайдаланылады. Гель негізіндегі КТ-ПТР-ның кемшіліктері салыстырмалы еңбек сыйымдылығы, қымбаттылығы және айқас контаминацияға бейімділігі болып табылады. Бұл кемшіліктер нақты уақыттағы КТ-ПТР зондты немесе сандық әдістерін пайдалану кезінде төмендейді. Осы әдістердің кез келгенінде тест-жүйеде және сынамалар өңделетін және дайындалатын жалпы зертханалық аймақтарда нуклеин қышқылын контаминациялауға жол бермеу үшін қатаң сақтық шараларын қабылдау қажет. Бұл әдістер сынамалардың кең спектрінен, соның ішінде сарысуды, жаңа алынған қанды, тіндерді, сүт пен ұрықты тікелей анықтауға мүмкіндік береді. Жоғары аналитикалық сезімталдық жеке сынамалар пулын скрининг немесе құрама сүтті тестілеу үшін



стратегияларды қолдануға мүмкіндік береді. Осы тәсілді пайдалана отырып, бірнеше жүз сиырлары бар табындарда бір немесе бірнеше жануарлардың СИ болуын анықтауға болады. КТ-ПТР нақты уақыт режимінде, сондай-ақ жасушалық өсірінділердің соңғы пассаждының супернатант мәдени скрининг үшін пайдалануға болады жылдам және сенімді әдіс болып табылады. Жалпы алғанда нақты уақыт режимінде КТ-ПТР өте жоғары сезімталдыққа ие және вакциналарды өндіру үшін пайдаланылатын биологиялық материалдардың скринингі үшін қолданылуы мүмкін.

Нәтижелерді түсіндіру кезінде вирустық РНК-ның анықталуы инфекциялық вирустың болуын білдірмейді. Нақты уақыттағы КТ-ПТР флуоресцентті белгіленген ДНК-зондтар негізінде пестивирустарды саралауға пайдалануға жол беріледі. Талдауға арналған праймерлерді геномның жоғары консервативті аймағында, негізінен 5-кодталмайтын аймақта немесе NS3 (ген р80)-да іріктеп алған дұрыс. Сезімтал кең реактивті талдау диагностикалық қолдану үшін ұсынылады, өйткені кейде әртүрлі пестивирустардың тұраралық берілуі кездеседі. Нақты вирусты одан әрі сәйкестендіру қажет болғанда вирустың одан әрі типі үшін пестивирус үшін спецификалық талдаулар қолданылуы мүмкін. Нуклеин қышқылдарын экстракциялау мен тазартуды қоса алғанда, нақты уақыттағы КТ-ПТР талдауының барлық аспектілерін мұқият оңтайландыру маңызды. Mg<sub>2</sub>, праймерлер, зонд және полимеразаның оңтайлы концентрациясын, сондай-ақ циклдық параметрлерін анықтау қажет. Тек праймерлер мен зондтың оңтайландырылған концентрациясын қосуды талап ететін толық тұжырымдалған және оңтайландырылған «пайдалануға дайын» «мастер-микстерді» пайдалануға жол беріледі. Циклдылықтың оңтайлы шарттары көбіне нақты мастер-микс үшін ұсынылады. Нақты өнімдер сынаманың нақты түріне арналған оңтайлы жиынтықты және сынаманы қандай да бір алдын ала өңдеу қажет екенін анықтау үшін бағалануға тиіс. Жаңа алынған қан сынамалары үшін антикоагулянт типі және шыны түтіктегі қан көлемі маңызды. Ингибиторы гепарин болып табылатын қан үлгілері ПТР реакция кезінде ЭДТА-ға қарағанда көп проблема бар. Егер шыны түтікте сынақтағы антикоагулянт концентрациясын арттыратын, ұсынылатын қан көлемі болмаса, бұл айырмашылықтар ұлғаяды. Ықтимал жалған теріс нәтижелерді анықтау үшін экзогенді РНК матрицасын («ішкі бақылау») РНК бөлінгенге дейін үлгіге қосу ұсынылады. Экзогендік тізбектілікке тән ПТР үшін праймерлер мен зондтарды қосу арқылы РНК бөлінуінің тиімділігін, сондай-ақ кез келген ПТР ингибиторларының болуын қадағалауға болады. Жалпы алғанда бұл сынамалардың барлық типтері үшін пайдалы. Ішкі бақылауды қосу, әсіресе шәует пен жаңа алынған қанды тестілеу кезінде қажет. Ішкі бақылауды кеңінен пайдаланған кезде ішкі бақылауды ПТР-амплификациясы диагностикалық ПТР-мен бәсекелеспейтініне және демек аналитикалық сезімталдықты төмендететініне көз жеткізу үшін тестілеу жүргізу қажет.

6.7.2 Сынамада РНК бөлінуінің тиімділігіне не нақты уақыттағы КТ-ПТР талдауына теріс әсер ететін заттардың бар екендігі туралы күдік болған кезде үлгіні физиологиялық ерітіндіде, жасушаларды өсіруге арналған ортада немесе буферлік ерітіндіде бірқалыпты сұйылтуды жүзеге асыру қажет. Шәует сынамасын 1/4 және жаңа 1/10 жаңа алынған қан қатынасында сұйылту керек. Нақты уақыттағы КТ-ПТР өте жоғары аналитикалық сезімталдыққа ие болғандықтан, сынаманы сұйылту ол болған кезде, сирек жағдайда вирустық РНК-ны анықтауды талдау мүмкіндігіне елеулі әсер етеді.

## **6.8 Шәуетте ВД вирусын анықтау үшін нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакцияны пайдалану**

6.8.1 Нақты уақыттағы КТ-ПТР ВД-дан еркіндікті растау мақсатында шәует үлгілерінің скринингі үшін өте пайдалы. Мұнда сипатталған нақты уақыттағы КТ-ПТР

## ҚР СТ 3501-2019

ДНК-нысана амплификациясы үшін праймерлердің бірнеше спецификалық тізбектерін және амплифицияланған өнімдерді табу үшін 5'-нуклеазды олигозондты қолданады. Олигозонд – бұл екі түрлі флуороформен белгіленген, тізбектілік үшін спецификалық, жеке олигонуклеотид. Бұл нақты уақыттағы КТ-ПТР пан-пестивирусты талдауы ВД1 және ВД2 штамдарының вирустық ДНК-сын, сондай-ақ шектес аурулардың, шошқаның классикалық обасы вирусын және көптеген атиптік пестивирустарды анықтауға арналған. Талдау селективті түрде геномапестивирустың 5'-трансляцияланбайтын аймағы негіздерінің 208 жұбынан тізбектілікті амплифициялайды. Праймерлер мен зондтар туралы егжей-тегжейлі төменде көрсетілген хаттамада келтірілген.

### 6.8.2 Сынамаларды дайындау, жабдықтар және реагенттер

а) Тест үшін пайдаланылатын сынамалар ІҚМ-ның өсірілген шәуетін немесе жаңа алынған шәует болып табылады. Егер үлгілер нақты уақыттағы КТ-ПТР көмегімен ғана тестіленсе, салқындатылған сынамаларды пайдалануға жол беріледі, бірақ зертханаға түскен кезде осы сынамалар төмен температурада болуға тиіс. Үздіксіз салқындату тізбегін қамтамасыз ету мүмкін болмаған жағдайда немесе вирусты оқшаулау жүргізілсе, шәует сынамасын зертханаға сұйық азотта немесе құрғақ мұзда тасымалдау керек. Зертханада сынамаларды сұйық азотта немесе  $-70^{\circ}\text{C}$  төмен температурада (ұзақ сақтау үшін) не  $+4^{\circ}\text{C}$ -та (7 күнге дейін қысқа мерзімге сақтау үшін) сақтау керек. Ескертпе: вирусты бөлуге арналған үлгілерді  $+4^{\circ}\text{C}$  температурада 1-2 күннен артық сақтауға болмайды.

б) Нақты уақыттағы КТ-ПТР-ді пайдаланғанда шәуеттің аз көлемін пайдалануға жол беріледі. Жиналған шәуеттің әрбір топтамасынан кемінде үш шыны түтіктен (әрқайсысының ең аз көлемі - 250 мкл.) алынуға тиіс. Үш шыны түтіктегі шәует нуклеин қышқылын экстракциялау үшін үлгі алу алдында біріктірілуі және мұқият араластырылуға тиіс.

в) Талдау жүргізу үшін нақты уақыттағы ПТР анықтау үшін тест-жүйе және деректерді талдау үшін тиісті бағдарламалық жасақтама талап етіледі. Осы тестті жүргізу үшін қосымша жабдықтар: шағын үйірткі, салқындатқыш блок, шағын сілкігіш және шағын тамшуырлар қажет. Нақты уақыттағы КТ-ПТР нуклеин қышқылының мақсатты молекулаларының өте аз мөлшерін анықтауға қабілетті. Осыған байланысты реагентті дайындауға арналған жеке және физикалық бөлінген «таза» учаскелерді (сынамалар немесе материалдар ПТР үшін пайдаланылмайтын жерде), сынама дайындауға арналған бөлінген аймақты және ПТР термоциклеріне және тиісті жабдықтарға арналған оқшауланған аймақты қоса алғанда, контаминацияны болдырмау үшін тиісті шаралар қажет. Әрбір аймақ үшін реагенттер мен жабдықтар бөлінуге тиіс. Контаминацияның төмен деңгейінің мүмкіндігін бақылау мақсатында кемінде бір теріс сынама параллель өңделеді. Контаминация көздері оң үлгілер немесе алдыңғы сынамалардың ПТР өнімдерімен қарама-қарсы контаминация болуы мүмкін.

Нақты уақыттағы КТ-ПТР-талдауы мынадай екі жеке рәсімді қамтиды:

а) Бірінші рәсім – нуклеин қышқылдарын экстракциялаудың тиісті бекітілген әдісін пайдалана отырып, шәуеттен ВД РНК-сын экстракциялау. Нуклеин қышқылын ұстау және тазалау үшін магнитті шарларды қолданатын тест-жүйелер ұсынылады. Шарларды магниттік бөлшектерді жартылай автоматты өңдеу жүйесімен өңдеген дұрыс.

б) Екінші рәсім – нақты уақыттағы КТ-ПТР жүйесіндегі бөлінген РНК матрицасының КТ-ПТР талдауы.

### 6.9 РНК экстракциясы

РНК немесе жалпы нуклеин қышқылы шәуеттің құрама сынамасынан экстракцияланады (бір жануардан бір мезгілде жиналған үш шыны түтік). Экстракциялау

алдында шәует сынамаларының пулын 1/4 фосфатты-буферлік желатинді тұз ерітіндісінде немесе осыған ұқсас буферленген ерітіндіде сұйылту қажет. РНК экстракциясы сынамалардың 50 мкл сұйылтылған пулын лизиске арналған буферге қосу жолымен аяқталады. Қанағаттанарлық нәтижелер үлгінің 25 мкл сұйылтылмаған пулын лизиске арналған буферге қосу арқылы алынады. Экстракцияны жинақтың диагностикалық жиынтығын өндірушінің нұсқауларын басшылыққа ала отырып аяқтаңыз.

### 6.10 Нақты уақыттағы КТ-ПТР талдау рәсімі

а) Реакциялық қоспа: Әр түрлі көздерден қол жетімді нақты уақытта ПТР амплификациясы үшін бірқатар жинақтар бар және белгілі бір таңдалған жинақтар нақты уақытта ПТР таңдалған платформасымен үйлесімді болуы тиіс.

б) Реагенттерді жеткізу және сақтау: Жиынтықты қолдану және сақтау кезінде өндірушінің нұсқаулықтары сақталуға тиіс. Праймерлер мен зондқа арналған бастапқы жұмыс ерітінділерін нуклеазасыз суды пайдалану арқылға тиісінше 20 мкМ және 3 мкМ концентрациясында дайындайды. Бастапқы ерітінділерді -20°C-та сақтайды, ал зондтың ерітіндісін жарыққа қолжетімділік болмайтын жерде сақтау керек. Праймерлер мен зондтарды мұздатууды-ерітуді шектеу және оларды сақтау мерзімін ұзарту үшін бір реттік немесе шектеулі пайдалануға арналған аликвоталарды дайындауға жол беріледі.

в) Праймерлер және зондтардың тізбектілігі

Бастапқы: ВПБ 190-F 5'-GRA-GTC-GTC-ART-GGT-TCG-AC.

Кері: V326 5'-TCA-ACT-CCA-TGT-GCC-ATG-TAC.

Зонд: TQ-pesti5'-FAM-TGC-YAY-GTG-GAC-GAG-GGC-ATG-C-TAMRA-3'.

г) Реакциялық қоспаларды дайындау

ПТР-ға арналған реакциялық қоспаларды ПТР-дың басқа операцияларынан және үлгілерді өңдеуден оқшауланған жеке бөлмеде дайындайды. Әрбір ПТР тесті үшін тиісті бақылау үлгілері енгізілуге тиіс. Матрицалық емес бақылау (МЕБ), тиісті теріс бақылау (ТБ) және екі оң бақылау (ОБ1, ОБ2) барынша аз түрде енгізіледі. Оң және теріс бақылаулар экстракциядан бастап экстракция аяқталғаннан кейін МЕБ-ны қосу арқылы аяқталатын талдаудың барлық кезеңдеріне енгізіледі. ПТР-амплификациясын 25 мкл көлемінде жүргізеді. Сипатталған хаттама микропланшеттер негізіндегі 96-ұяшықты жүйені пайдалануға негізделген, бірақ шағын шыны түтіктер қолданылатын басқа да нұсқалар да қолайлы. ПТР-ге арналған планшеттің әрбір ұяшығында 20 мкл реакциялық қоспа және 5 мкл сынама мынадай үлгіде болуға тиіс:

2 × RT 12,5 мкл. буфер – коммерциялық жиынтықтан;

1 мкл. ВПБ190-F Тік праймер (20 мкМ);

1 мкл. кері праймер V326 (20 мкМ);

1 мкл. TQ-пести зонд (3 мкМ);

2 мкл. тРНК (40 нг/мкл);

1,5 мкл. су;

1 мкл. 25 × ферментті қоспа;

5 мкл. сынама (немесе бақылаулар - МЕБ, ТБ, ОБ1, ОБ2)

д) Бақылауларды таңдау

МЕБ: әдетте ПТР реакциясын жүргізген кезде сынаманың орнына қосылатын нуклеазадан бос судағы тРНК-дан тұрады.

ТБ: ФТБ немесе соған ұқсас буфер қолданылады. Шәует сынамаларын тестілеуге арналған бақылау үлгілері серонегативті бұқалардан алынған теріс шәует болуға тиіс. Бұл ретте пайдаланылатын талдау оның сенімді экстракциясын және шәуетпен амплификациясын растау үшін теріс және оң үлгілермен мұқият тексерілуге тиіс.

ОБ: екі оң бақылау бар (ОБ1 = бірқалыпты - [Ct 29-32] және ТБ2 = әлсіз [Ct 32 35])

## ҚР СТ 3501-2019

оң). Оң бақылау ретінде табиғи жұқтырған бұқалардың оң шәуеті қолайлы. СИ бар бұқадан алынған шәует қолайлы деп саналмайды, өйткені вирустық жүктемелер әдетте өте жоғары және экстракция немесе талдау тиімділігінің қандай да бір қалыпты төмендеуіне сенімді нұсқау бермейді. Балама ретінде ВД вирусының белгілі бір көлемін қоса отырып, теріс шәуетті пайдалануға жол беріледі. Егер басқа үлгілер әдеттегі ОБ ретінде пайдаланылса, онда экстракциялау мен ПТР-талдаудың барлық процестері АСИ-мен ауыратын бұқалардан және жіті инфекциямен ауырып сауыққан бұқалардан алынған белгілі оң шәуетті пайдалана отырып мұқият тексерілуге тиіс. Егер бұл үлгілерге қолжетімсіз болса, ал көрсетілген үлгілер валидация мақсатында пайдаланылса, вирус деңгейі өте төмен бірқатар үлгілерді қосу керек. Экзогенді бақылауды әрбір тестіленетін үлгіге күнделікті негізде қосу бақылау ретіндегі оң шәуеттің болмауының айтарлықтай дәрежеде орнын толтырады және әрбір жеке үлгі үшін талдау тиімділігін мониторингтеу арқылы қосымша артықшылықтар береді. Оң бақылау үлгілерін титрі жоғары вирус қорларынан қарама-қарсы контаминацияны болдырмау үшін мұқият дайындау керек және оларды алдын ала дайындап, «пайдалануға дайын» концентрацияда және негізінен «бір реттік» көлемде мұздату керек.

е) Алынған үлгілер ПТР-ге арналған қоспаға жеке үй-жайда қосылады. Бақылаулар мынадай тәртіппен соңынан қосылады: МЕБ, теріс, содан кейін екі оң бақылау.

ж) нақты уақыттағы ПТР.

ПТР-ге арналған пластина немесе шыны түтіктер ПТР үшін арнайы бөлінген үй-жайда нақты уақыттағы ПТР-ді анықтау жүйесіне орналастырылады.

Кейбір қоспаларда көптеген әртүрлі талдауларға сәйкес келетін бірдей реакция шарттары бар. Мысалы, ПТР анықтау жүйесі тест үшін мынадай үлгіде бағдарламаланған:

1 × 48°C 10 минут;

1 × 95°C 10 минут;

45 × (95°C 15 секунд, 60°C 1 минут)

и) Нақты уақыттағы ПТР деректерін талдау

Бағдарламалық жасақтама кез келген фондық сигналдың орнын толтыру арқылы нәтижелерді автоматты күйге келтіруге теңшеледі, ал шекті деңгей таңдалған бағдарламалық жасақтамаға арналған өндірушінің нұсқауларына сәйкес орнатылады. Бұл жағдайда шекті мән 0,05-ке тең деп белгіленеді.

к) Нәтижелерді түсіндіру

Тесттік бақылаулар - барлық бақылаулар күтілетін нәтижелерді беруге тиіс, ОБ1 және ОБ2 оң бақылаулары белгіленген диапазонға түссе, ТБ және МЕБ-ның матрицалық емес бақылауында шекті мәннен аспауға тиіс.

Сынақ үлгілері:

1) Оң нәтиже. Циклдің шекті мәні 40-тан аз кез келген таңдау оң болып саналады.

2) Теріс нәтиже. Циклдің шекті мәнін көрсетпеген кез келген үлгі теріс болып саналады. Алайда үлгінің теріс нәтижесі туралы хабарламас бұрын экзогендік ішкі бақылаудың тиімділігін тексеру және нәтижені осы бақылау үшін рұқсат етілген ауқым шегінде көрсету қажет (мысалы, шекті циклдің мәні МЕБ-дан 2-3 бірліктен артыққа жоғары емес).

### 6.11 Антигенді анықтау үшін иммуноферменттік талдау

ИФТ көмегімен антигенді табу жекелеген жануарлардың СИ анықтау үшін кеңінен таралған әдіс болды. Бұл талдау жіті инфекция жұқтырған жануарларды анықтауға арналмаған. Бұл талдаулардың талдауларда немесе вакциналар өндірісінде пайдаланылатын шәуетті немесе биологиялық материалдарды скринингтеуге арналмағанын атап өткен жөн. Жинақтардың көпшілігі сэндвич-ИФТ принципіне

негізделген, бұл кезде қармаушы антидене қатты фазамен байланысқан, ал детекторлық антидене пероксидаза сияқты белгімен конъюгацияланған. Амплификация сатысында биотин мен стрептавидинді анықтау жүйесін пайдалану талдаудың сезімталдығын арттыру үшін қолданылады. Моноклонды және поликлонды жүйелер бар. Тест перифериялық қан лейкоциттері лизаттарындағы ВД (NS2-3 немесе ERNS) антигенін өлшейді; қармаушы ИФТ (ERNS қармаушы ИФТ) антигенінің жаңа буыны қандағы, сондай-ақ плазма немесе сарысу үлгілеріндегі (ERNS қармаушы ИФТ) ІҚМВДв антигендерін анықтауға қабілетті. Ең жақсы әдістердің бірі вирустың окшаулануына ұқсас сезімталдық береді және ұзақ сақталушы инфекция серопозитивтілікпен үйлесетін сирек жағдайларда қолайлы болуы мүмкін. Уақытша вiremия салдарынан ИФТ антигенінің ВД жіті инфекциялары кезінде вирустарды анықтау үшін тиімділігі төмен.

Уызбен ІҚМВД аналық антиденелері түскен жас бұзаулар үшін ИФТ NS2-3 тиімділігі төмен болуы мүмкін. Нақты уақыт режиміндегі КТ-ПТР осы жағдайларда анықтаудың барынша сезімтал әдісі болуы ықтимал, бірақ сондай-ақ ERNS ИФТ-ның сезімтал және сенімді тест екендігі, әсіресе тері (құлақ) биопсиясы үлгілерін пайдаланған кезде дәлелденген.

## 6.12 Иммундық гистохимия

Ферментпен белгіленген иммундық әдістер, әсіресе қолайлы МАд (моноклонды антиденелер) бар жерде тіндердің кесінділерінде ВД антигенін анықтау үшін қолданылады. Алайда бұл талдаулар халықаралық сауда кезінде жануарларды сертификаттауға келмейді және оларды пайдалану диагностикалық зерттеулермен шектелуге тиіс. Қолданылатын реагенттер мен рәсімдердің спецификалық емес реактивтілікті болдырмау үшін толығымен валидацияланғаны маңызды. Ірі қара малды зерттеу кезінде кез келген тінді қолдануға болады, бірақ әсіресе лимфа түйіндерін, қалқанша безін, теріні, миды, ұлтабарды және плацентаны пайдаланған тиімді.

## 7 Серологиялық тесттер

7.1 ВД-ге антиденелер ірі қара малдың сарысуында ВН немесе ИФТ стандартты әдістерінің көмегімен, бірнеше жарияланған әдістердің бірін пайдалана отырып немесе коммерциялық жиынтықтардың көмегімен анықталады. Серология иммунитет деңгейін анықтау үшін, табында СИ-мен ауыратын жануарлардың болуын анықтау үшін, репродуктивті ауруларды және ВД вирусының ықтимал болуын зерттеуге көмек көрсету үшін, шәует жинау үшін пайдаланылатын бұқалардың серологиялық мәртебесін анықтау үшін және жақында ауырған инфекцияның болуын анықтау үшін пайдаланылады. Сүт үлгілеріндегі ИФТ-ға антиденелер ВД бойынша мал басының мәртебесін анықтайды. Егілмеген табында ИФТ-ның жоғары мәні (0,8 немесе одан көп абсорбция бірліктері) табынның жақында тұрақты жұқтырған бір немесе бірнеше жануарлардың болуына байланысты ІҚМВД-ға ұшырағанын көрсетеді. Керісінше өте төмен немесе теріс мән ( $\leq 0,2$ ) вiremиялық жануарлардың болу ықтималдығының аз екенін көрсетеді. Алайда ИФТ мәндері мал шаруашылығы әдістеріндегі айырмашылықтарға, вакцинаны жуырдағы енгізуге байланысты, сондай-ақ антиденелерді антиденелерді талдаудың өзіне кедергі келтіруі мүмкін, жалпы сүтте вирустық антигеннің болуына байланысты фермаларда жануарлардың СИ болуының сенімді индикаторы болмайды. Аздаған жас төлде (9-18 айлық) антидене мәртебесін анықтау табындағы ВД соңғы берілуінің индикаторы ретінде пайдаланылды, бірақ бұл тәсіл табындағы жануарлардың әртүрлі топтары арасындағы байланыс дәрежесіне және көрші табындардың әсер етуге әлеуетті бейімділігіне байланысты болады. ВН-ге тесттер көбіне реттеу мақсатында қолданылады (мысалы,



## ҚР СТ 3501-2019

шәует донорларын тестілеу), ал ИФТ (коммерциялық дайындалған жиынтықтар түрінде) диагностикалық мақсаттар үшін пайдаланылады. Бақылаудағы оң және теріс стандартты сарысулар әрбір ИФТ және ВН тестіне енгізілуге тиіс. Олар нәтижелерді зерттеу жарамды деп саналуы үшін берілген шектерде беруге тиіс. «Сарысуды бақылау» ВН реакциясын қою кезінде әрбір зерттеу кезінде сынамаңың уыттылығын бақылау ретінде қосылуға тиіс.

### 7.2 Вирусты бейтараптандыру реакциясы

7.2.1 2-типті ВД вирусына антиденелердің төмен деңгейі 1-типті вирус штамы пайдаланылатын бейтараптабндыру тестінің көмегімен анықталмауы мүмкін және керісінше болады. Тестте диагнозшының пікірінше, есептілікті төмендетуге әкеп соқтыруы мүмкін болғандықтан, қатыстырылатын біреу емес, 1-типті де және 2-типті де ВД вирусының қолданылғаны маңызды. Бұл тестті есепке алуды жеңілдететіндіктен, ВН реакциясы тесттері үшін ВД жоғары цитопатиялық, зертханалық бейімделген штамдары қолданылады. «Oregon C24V» және «NADL» - кеңінен қолданылатын екі цитопатиялық штамм бар. Дегенмен, қазіргі уақытта бұл қажет деп саналатын жерде, әсіресе жергілікті вирус штамын қолдау үшін цитопатиялық емес штамдардың өсуін немесе бейтараптандыруын оңай анықтауға мүмкіндік беретін иммундық белгі әдістеріне қолжетімді.

#### 7.2.2 Аппаратура, материалдар, реактивтер

- Микротитрациялық планшеттер (96-ұяшықты)
- Көп арналы мөлшерлеуіштер, бір арналы мөлшерлеуіштер, стерильді пластикалық ұштықтар
- ВД цитопатогенді штамы
- Жасушалы желілер паспортына сәйкес жасушалардың өсінділеріне арналған орта
  - Вирустық зертханаға арналған стандартты зертханалық жабдық (зарарсыздандырылған жұмыс үстелі, инвертирленген микроскоп, СО<sub>2</sub>-инкубатор (37° С), үйірткі, термоүйірткі (80 °С), тоңазытқыш, мұздатқыш камера (минус 20° С, минус 70° С), термошейкер (37° С)

- Микропланшеттерді жууға арналған аппарат

- Вортекс

#### 7.2.3 Тест жүргізу процедурасы

а) Тестіленетін сарысуларды 56°С-та 30 минут бойы қыздыру арқылы белсендіреді.

б) 1/4 сұйылтудан бастап, түбі тегіс жасушалық өсірінділерге арналған 96-ұяшықты микротитрлеу планшетінде тестіленетін сарысуларды сериялық екі рет сұйылту арқылы, сұйылтқыш ретінде жасушаларды өсіруге арналған органы пайдаланады. Әрбір үлгі үшін талап етілетін дәлдік дәрежесіне байланысты әрбір сұйылту кезінде үш немесе төрт ұяшық пайдаланылады. Сарысуды әрбір сұйылтқан кезде әрбір сынама үшін вирустық цитопатологияны имитациялауы немесе вирустың репликациясына кедергі келтіруі мүмкін сынамаңың уыттылық белгісін қадағалау үшін бір ұяшықты вируссыз қалдырады. Бақылау оң және теріс сарысулары тесттердің әрбір сериясына қосылуға тиіс.

в) Әрбір ұяшыққа тін өсірінділері үшін 100 ЦПД<sub>50</sub> (50%) инфекциялық дозасы бар ВД цитопатиялық штамы қорының тең көлемі қосылады (мысалы, 50 мкл.). Кейбір қосалқы ұяшықтарда сондай-ақ вирус белсенділігін тексеру үшін цитопатиялық штамм қорына кері титрлеу жүргізіледі (рұқсат етілген шектер 30 300 ЦПД<sub>50</sub>).

г) Планшет 37°С-та 1 сағат бойы инкубацияланады.

д) Қолайлы жасушалары (мысалы, ІҚМ мұрын қуыстары, ІҚМ атабездері) бар колба трипсинизацияланады және жасушалардың концентрациясы  $1,5 \times 10^5$ /мл. дейін жеткізіледі. 100 мкл жасушалық суспензия микротитрлеуге арналған планшеттің әрбір ұяшығына енгізіледі.

е) Планшет 37°С-та 4-5 күн бойы 5% СО<sub>2</sub> ортада немесе жабық пластинада

инкубацияланады.

ж) Ұяшықтар цитопатиялық әсердің (ЦПЭ) болуына микроскопияланады немесе сәйкес келетін моноклонды антиденелерді пайдалана отырып бекітіледі және иммундық пероксидазамен бояумен боялады. Әрбір сарысудың ВН титрі вирус 50%-ға бейтараптандырылатын сұйылту болып саналады. Мұны Спирмен-Кербер немесе Рид Мюнх әдістерімен есептеуге болады. Серонегативті жануарда ең төмен сұйылту кезінде бейтараптандыру жоқ (1/4), бұл түпкілікті сұйылтуға 1/8 балама. Антиденелердің титрін дәл салыстыру үшін, атап айтқанда титрдің маңызды (төрт еседен артық) өзгерістерін көрсету үшін үлгілерді бір тестте параллель тексеру керек.

### 7.3 Иммуноферменттік талдау

7.3.1 ИФТ-ның жанама да, бұғаттайтын да түрлері қолданылуы мүмкін. Бірнеше коммерциялық жиынтықтар бар. Вирусты бейтараптандыруға арналған тест жағдайындағы сияқты ВД вирусының бір генотипінің антигенін пайдалана отырып конфигурацияланған ИФТ басқа генотип индукцияланған антиденелерді тиімді анықтамауы мүмкін. Сондықтан жиынтықтарды тест жүргізілетін жердегі айналымдағы генотиптер мен штамдардың спектріне антиденелерді анықтау қабілеттерін ескере отырып таңдау керек.

Әр түрлі әдістерде және ИФТ түрлерінде жеткізілетін тест-жүйелердің тест-жүйенің сериясына қарай жаңартылып, толықтырылуына байланысты кейбір параметрлер мен процедуралар өзгеруі мүмкін.

7.3.2 Тестті баптаудағы негізгі қиындық тиімділігі жеткілікті вирустық антигенді дайындау болып табылады. Вирус жасушалардың жоғары пермиссивті түрін пайдалана отырып өсірудің оңтайлы жағдайларында өсірілуі тиіс. Ортада қолданылатын кез келген сарысу ВД-ның өсуін тежемеуге тиіс. Жасушаларды жинақтауға арналған оңтайлы уақыт өсірудің жеке жүйесі үшін эксперименталды түрде анықталуға тиіс. Вирусты тығыздық градиентінде шоғырлануы және үйірткілеу арқылы тазартуға болады. Балама түрде қуатты антиген Nonidet P40, N-деканоил-М-метилглюкамин (Mega 10), Triton X-100 немесе 1-октилбета-D-глюкопиранозид (ОГП) сияқты детергенттердің инфекцияланған жасушалық өсірінділерін өңдеу жолымен алынуы мүмкін.

#### 7.3.3 Жабдық және реагенттер

- Микротитрациялық планшеттер
- Көп арналы мөлшерлеуіштер, бір арналы мөлшерлеуіштер, стерильді пластикалық ұштықтар

- Вирустық зертханаға арналған стандартты зертханалық жабдық (зарарсыздандырылған жұмыс үстелі, инвертирленген микроскоп, CO<sub>2</sub>-инкубатор (37° С), үйірткі, термоүйірткі (80° С), тоназытқыш, мұздатқыш камера (минус 20° С, минус 70° С), термошейкер (37° С)

- Микропланшеттерді жууға арналған аппарат

- Вортекс

- бұзау шәуетінің қосымша жасушаларының роликті өсінділері

- 2 % ОГП

- Бикарбонатты буфер

- 0,05 % Полисорбат 20 (Твин20) немесе Полисорбат 80 (Твин 80)

- Сарысуға арналған сұйылтқыш (0,5 М NaCl; 0,01 М фосфатты буфер; 0,05 % Полисорбат 20 (Твин 20); 0,001 М этилендиаминтетрасірке қышқылы; 1 % поливинилпирролидон, рН 7,2)

- Сутегі асқын тотығы/тетраметилбензидин

- Күкірт қышқылы



## ҚР СТ 3501-2019

- ИФТ планшетіне арналған ридер

### 7.3.4 Тест жүргізу процедурасы

а) Көптеген инфекциялары (шамамен бір) бар бұзау атабезінің қайталама жасушаларының роликті өсірінділері ВД Орегон С24V штамымен инокуляцияланады, сарысусыз ортамен жабылады және 37°C-та 24 сағат бойы инкубацияланады.

б) Жасушалар қырылып алынады және түйіршіктеледі. Шөгінді үсті ортасы лақтырылады. Шөгіндіні ФТБ-да 2% ОГП екі көлемімен 4°C-та 15 минут бойы өңдейді және жасушалық дебристі алып тастау үшін үйірткілейді. Супернатантты антигенді 70°C-та шағын аликвоталармен сақтайды немесе лиофилизациялайды. Инфекцияланбаған жасушалар бақылау антигенін алу үшін параллель өңделеді.

в) Антиген берілген сұйылтуға дейін 0,05 М бикарбонатты буферде, рН 9,6 араластырылады. Микротитрациялық ИФТ планшетінің кезектесетін қатарлары +4°C-та түні бойы вируспен және бақылау антигендерімен жабылады. Тестте пайдалану үшін планшеттерді 0,05% Полисорбат 20 (Твин 20) немесе Полисорбат 80 (Твин 80) (ФТБТ) ФТБ-да жуады.

г) Сыналатын сарысуларды сарысуға арналған сұйылтқышпен (0,5 м NaCl; 0,01 М фосфат буфері; 0,05% Полисорбат 20 (Твин 20); 0,001 М этилендиаминтетрасірке қышқылы; 1% поливинилпирролидон, рН 7,2) 1/50 қатынасында сұйылтады және вирустарға және бақылау ұяшықтарына қосады, ұяшықтарды жабады және 37°C-та 1 сағат бойы инкубациялайды. Планшеттер бес рет ФТБТ-да жуылады.

д) Анти-бұқа IgG- қоян конъюгатпероксидазаларын 37°C-та 1 сағат бойы белгілі бір сұйылтуда (сарысуға арналған сұйылтқышта) қосады, содан кейін планшеттер ФТБТ-да бес рет қайта жуылады.

е) Сутегі тотығы/тетраметилбензидин сияқты қолайлы ферментті субстрат қосылады. Бояу дамығаннан кейін реакция күкірт қышқылымен тоқтайды және ИФТ планшетіне арналған ридерде оптикалық тығыздық өлшенеді. Бақылау антигенімен алынған мән әрбір сарысу үшін сіңірудің таза шамасын алу үшін сыналатын сынама мәнінен шегеріледі.

ж) Сынамадағы таза абсорбция мәнін түрлендіру ұсынылады: таза абсорбцияны 1,0-ге жуық абсорбциясы бар стандартты оң сарысудың таза абсорбциясына бөлу жолымен оң арақатынас (немесе позитивтілік пайызы).

Ерітіндіні шұңқырдағы бояу зерттелетін үлгілерде диарея вирусына тән антиденелердің сандық болуы немесе болмауы туралы куәландырады

---

**ӘОЖ 636.2**

**МСЖ 65.020.30 (NEQ)**

**Түйін сөздер:** вирустық диарея, ірі қара малдың вирустық диареясы, зертханалық диагностика, агентті сәйкестендіру.

---





## НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

---

**Животные**

### **МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ**

**СТ РК 3501-2019**

*(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, NEQ)*

**Издание официальное**

**Комитет технического регулирования и метрологии  
Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан  
(Госстандарт)**

**Нур-Султан**



## Предисловие

### 1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН ТОО «Elit Art»

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан от 11 декабря 2019 г. № 457-од.

**3** Настоящий стандарт разработан с учетом Руководства Международного эпизоотического бюро «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals» (Животные. Методы лабораторной диагностики вирусной диареи) глава 3.4.7

Степень соответствия – неэквивалентная (NEQ).

Перевод с английского языка - (en).

**4** В настоящем стандарте реализованы положения Законов Республики Казахстан: «О стандартизации» от 5 октября 2018 года № 183-VI, «О ветеринарии» от 10 июля 2002 года № 339.

### 6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему Стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном каталоге «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты».*

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан.

## Введение

Вирусная диарея крупного рогатого скота - вирусная контагиозная болезнь, характеризующаяся воспалением и изъязвлениями слизистых оболочек пищеварительного тракта и проявляющаяся ринитом, лихорадкой, диареей и иногда хромотой.

Заболевание чаще проявляется у крупного рогатого скота в возрасте до 2-х лет. Молодняк более восприимчив к заражению аэрогенным или алиментарным путем. Вирус может передаваться интраплацентарно и через сперму, вызывая патологию воспроизводства. Болезнь может протекать скрытно (безсимптомно) либо привести к осложнениям со летальным исходом. Клинические проявления и тяжесть заболевания могут различаться в зависимости от штамма вируса. Вирусная диарея также вызывает подавление иммунитета, что приводит к повышению восприимчивости инфицированных животных к заражению другими вирусами и бактериями. Клиническое воздействие чаще встречается на животноводческих фермах, с высоким уровнем воспроизведения потомства. Животные, подверженные внутриутробному инфицированию в первом триместре беременности, почти всегда являются хронически инфицированными (ХИ). ХИ животные обеспечивают основной объем вируса в популяции и выделяют большое количество вируса с мочой, фекалиями, другими выделениями, молоком и спермой. Вирус распространяется в основном при тесном контакте между ХИ животными и другим скотом. Выделение вируса остро инфицированными животными обычно не приводит к серьезным последствиям. Данный вирус может сохраняться в окружающей среде в течение коротких периодов времени или передаваться с загрязненным репродуктивным материалом. Вертикальная передача играет важную роль в эпизоотологии и патогенезе данного заболевания.

Возбудитель вирусной диареи представляет собой одиночный линейно-позитивный РНК-вирус рода Pestivirus семейства Flaviviridae. Род содержит ряд видов, включая два генотипа вируса (типы 1 и 2) и близкородственные вирусы классической чумы свиней и пограничной болезни овец. Вирусы в данных генотипах демонстрируют значительное антигенное отличие друг от друга, и в пределах 1 и 2 типа изоляты вируса демонстрируют значительное биологическое и антигенное разнообразие. Внутри двух данных генотипов с помощью генетического анализа можно выделить другие разновидности. Два генотипа можно дифференцировать друг от друга и от других пестивирусов с помощью моноклональных антител, направленных против основных гликопротеинов E2 и ERNS, либо генетическим анализом. Полимеразной цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) позволяет типизировать вирус непосредственно из образцов крови.

БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3501-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан



**НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН****Животные****МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ**

Дата введения 2020-07-01

**1 Область применения**

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

- метод ПЦР;
- серологические методы (ИФА, РН);
- иммуногистохимический метод;
- вирусологические методы.

**2 Обозначения и сокращения****1-октилбета-D-глюкопиранозид; ОГП****Иммуноглобулин; IgG****Дезоксирибонуклеиновая кислота; ДНК****Иммуногистохимический метод; ИГХ****Имуноферментный анализ; ИФА****Крупный рогатый скот; КРС****Моноклональные антитела; МАт****Микромоль; мкМ****Микролитр; мкл****Моль; М****Миллиграмм; мг****Нематричный контроль; НМК****Нуклеиновая кислота; НК****Отрицательный контроль; ОК****Полимеразной цепная реакция с обратной транскрипцией; ОТ-ПЦР****Полимеразной цепная реакция; ПЦР****Положительных контроля; ПК****Пороговый цикл; Ct****Вирусная диарея; ВД****Рибонуклеиновая реакция; РНК****Реакция нейтрализации; РН****Транспортная рибонуклеиновая кислота; тРНК****Фосфатно-солевом буфере; ФСБ****Фосфатно-солевой буфер с твином; ФСБТ****Хроническая инфекция; ХИ****Хронической инфекции яичек; ХИЯ****Цитопатогенный эффект; ЦПЭ****Цитопатогенная доза; ЦПД****Этилен-Диамин-Тетрауксусная Кислота; ЭДТК**



## СТРК 3501-2019

### 3 Общие положения

Лабораторная диагностика вирусной диареи проводится методами, направленными на выявление вирусных антигенов или вирусной РНК в крови и тканях.

Вирус также может быть выделен путем инокуляции отобранных образцов на чувствительные клеточные культуры с последующей иммунизацией для выделения репликации вируса в культурах.

### 4 Отбор и подготовка проб

#### 4.1 Острая инфекция

4.1.1 Животные с острой инфекцией выделяют относительно низкое количество вируса в течение короткого периода времени (от 7 дней до 10 дней). При этом клинические признаки могут проявляться на более поздних стадиях виремии, что приводит к сокращению времени для обнаружения вируса.

При респираторных или кишечных формах заболевания пробы должны быть отобраны у группы пораженных животных, преимущественно у недавно зараженных особей. Мазки отбираются со слизистой носа и конъюнктивы животных с признаками поражений дыхательных путей. При наличии признаков поражения желудочно-кишечного тракта отбираются пробы из прямой кишки и фекалии.

Пробы легких и селезенки отбираются у павших животных.

Вирусная РНК может быть обнаружена с помощью метода полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Данный метод обладает высокой чувствительностью и позволяет обнаруживать геном неинфекционного вирусные частицы.

Проведение серологических исследований дает высокую вероятность выявления или исключения наличия инфекции. При данном методе исследуется сыворотка крови, отобранная у животных парно при острой форме течения заболевания и от выздоравливающих животных (через 21 день после острой формы от 8-10 животных).

4.1.2 Подтверждение того, что абортирование, мертворождение или ранняя смерть вызваны вирусной диареей затруднено, так как между началом инфекции, смертью или абортированием может пройти значительное время. При отборе проб необходимо учитывать, для выявления чего отбираются пробы: вирусных компонентов или антител.

Селезенка и легкие отбираются для обнаружения вируса. Перикардиальные или плевральные жидкости отбираются для проведения серологических исследований. В некоторых случаях вирус может быть выделен из ткани плода, особое внимание следует уделить обнаружению вирусного антигена с помощью ИФА либо выявлению вирусной РНК с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Серологические исследования проводятся методами ИФА и реакцией нейтрализации вируса. При этом качество проб и уровень бактериального загрязнения могут повлиять на качество постановки реакции нейтрализации вируса.

#### 4.2 Хронические инфекции

ИФА и ОТ-ПЦР, обладающие относительно высокой чувствительностью, широко используются для обнаружения вирусных антигенов или РНК как у живых, так и у павших животных.

Также, используется выделение вируса, направленное на обнаружение нецитопатогенного вируса в крови, также вирус может быть идентифицирован

иммуногистохимическим методом (ИГХ). На выделение вируса из крови телят в возрасте до 4-5 месяцев может повлиять присутствие материнского антитела к вирусу ВД. У взрослых животных с хронической вирусемией наблюдается низкий уровень антител из-за их способности к сероконверсии в штаммы вируса (включая вакцины), антигенно отличающиеся от хронического вируса. Массовый (резервуар) или индивидуальный отбор проб молока используется для мониторинга молочных стад на наличие ХИ животных. Используются методы диагностики как ИФА на антиген, так и ОТ-ПЦР для выделения вируса. Для подтверждения диагноза хронической инфекции, животные исследуются не ранее чем через 3 недели, путем испытания образцов крови на наличие вируса и признаков сероконверсии.

#### 4.3 Поражение слизистых оболочек

Для лабораторного подтверждения диагноза в пробах слизистых оболочек необходимо изолировать цитопатогенный вирус. Данный биотип иногда может быть выделен из крови, но может быть выделен более последовательно из множества других тканей, в частности селезенки, кишечника и пейеровых бляшек. Изоляция вируса легко осуществляется из селезенки, которая легко отбирается и редко является токсичной для клеточной культуры.

#### 4.4 Репродуктивный материал

Сперма от быков-доноров отбирается для исследования на наличие инфекции до сбора спермы. Необходимо подтверждение, что быки не являются ХИ, не подвергались острой инфекции, а также установить их серологический статус. Первично необходимо провести исследование проб цельной крови или сыворотки. Для определения отсутствия у серопозитивного быка хронической инфекции яичек (ХИЯ) пробы спермы отбираются не менее трех раз с интервалом не менее 7 дней из-за возможности прерывистого выделения вируса на низком уровне, особенно на ранней стадии заражения. Также необходимо отбирать небольшое количество проб от каждого отбора или соответствующий объем свежеполученной спермы.

### 5 Методы диагностики

Таблица 1- Методы диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота и их назначение

Метод	Назначение					
	Популяция свободная от инфекции	Отдельные животные свободные от инфекции до их передвижения	Содействие политике ликвидации	Подтверждение клинических случаев	Распространение инфекции - наблюдение	Иммунный статус отдельных животных либо популяций после вакцинации
Обнаружение агента <sup>1</sup>						
Изоляция вируса	+	+++	++	+++	-	-



## Окончание таблицы 1

Метод	Назначение					
	Популяция свободная от инфекции	Отдельные животные свободные от инфекции до их передвижения	Содействие политике ликвидации	Подтверждение клинических случаев	Распространение инфекции - наблюдение	Иммунный статус отдельных животных либо популяций после вакцинации
Выявление антигена методом ИФА	++	+++	+++	+++	+++	-
Рекомендуется применять нескольких разных методов обнаружения вируса на один и тот же образец						
Метод	Назначение					
	популяция свободная от инфекции	отдельные животные свободные от инфекции до их передвижения	Содействие политике ликвидации	Подтверждение клинических случаев	Распространение инфекции - наблюдение	Иммунный статус отдельных животных либо популяций после вакцинации
Выявление антигена методом ИГХ	-	-	-	++	-	-
Обнаружение НК методом ПЦР	+++	+++	+++	+++	+++	-
Определение реакции иммунной системы						
ИФА	+++	++	+++	-	+++	+++
РН	+	+++	++	-	+	+++
<p>+++ = Рекомендуемый метод;            ++ = Подходящий метод;            + = Может использоваться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы серьезно ограничивают его применение;            - = Не подходит для этой цели.</p> <p>ПЦР = полимеразная цепная реакция;            РН = реакция нейтрализации вируса;            ИГХ = иммуногистохимический метод;            ИФА = иммуноферментный анализ.            НК – нуклеиновые кислоты</p>						

**6 Идентификация агента**

6.1 Для предотвращения продажи животных или дериватов животных (особенно спермы и эмбрионов), инфицированных вирусной диареей крупного рогатого скота (ВД), необходимо проверить наличие инфекционного вируса (выделение вируса), вирусных



антигенов (обнаружение антигена методом ИФА) или РНК (ОТ-ПЦР в режиме реального времени) в крови отправляемого животного или донора генетического материала (сперма или эмбрионы). Исключение составляют серопозитивные быки, у которых должна быть проверена сперма. Серологические исследования используются для подтверждения отсутствия острой инфекции у серонегативных животных, или для определения серологического статуса быков-доноров. Такие методы, как ИГХ или гибридизация без предварительной вирусной амплификации непосредственно на тканях, из-за их переменной чувствительности не являются достаточной гарантией защиты от ВД для международной торговли. Иммуоокрашивание является важным компонентом выделения вируса в клеточной культуре для обнаружения присутствия нецитопатогенных штаммов ВД, которые в основном встречаются в полевых инфекциях.

6.2 Все методы должны быть валидированы путем тестирования на известных неинфицированных и инфицированных популяциях крупного рогатого скота, включая особей с низкими и высокими уровнями вирусии. Методы, основанные на поликлональных или МАТ-связывающих анализах (ИФА или ИГХ), иммунной метке (ИМ) или распознавании нуклеиновых кислот (ПЦР), должны выявлять полный спектр антигенного и генетического разнообразия, обнаруженного среди вирусов ВД.

### 6.3 Изоляция вируса

6.3.1 Изоляция возбудителя ВД очень надежна. Очень жесткие требования к обеспечению того, чтобы клеточные культуры и компоненты среды создавали систему, являющуюся высокочувствительной и неподверженной риску наличием либо низким уровнем специфических антител ВД, либо вируса. Изоляция вируса дает возможность обнаружить инфекционный вирус, но при этом на это влияет качество пробы. Для обнаружения низких уровней вируса, которые могут присутствовать в некоторых пробах, особенно в сперме, может потребоваться исследование гораздо больших объемов пробы. Это можно устранить с помощью ИФА или с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

6.3.2 Вирус может быть выделен в ряде монослойных клеточных культур крупного рогатого скота (например, почки, легкие, тестикулы телят или носовая пазуха). Также используются клеточные культуры овец. Допускается заморозка первичных или вторичных культур в виде клеточных суспензий в жидком азоте. Затем они проверяются на серии пассажей или высеваются на другие чувствительные клетки для проверки на предмет отсутствия загрязнений и оценки их чувствительности по сравнению с утвержденной партией клеток перед обычным использованием. Использование таких процедур снижается при использовании перевиваемых клеточных линий, полученных от животных свободных от ВД, однако их статус свободы от ВД и их восприимчивость должны регулярно контролироваться. Перевиваемые клеточные линии должны использоваться в системе «последовательных пассажей», где они используются только в ограниченном диапазоне пассажа, в пределах которого они должны показать приемлемую чувствительность к инфекции ВД. Следует учитывать, что различия могут быть в клеточных культурах, полученных из разных источников, поэтому перед обычным использованием их пригодность подтверждается дополнительно.

6.3.3 Нецитопатогенный вирус ВД является распространенным загрязнителем тканей крупного рогатого скота поэтому клеточные культуры проверяются на предмет отсутствия побочной персистенции вирусом путем регулярного тестирования. Клетки выращиваются в проверенной среде для культивирования клеток, и исследуется большая площадь клеток. Проверка нескольких лунок 96-луночного планшета не является достаточным, следует проводить исследование всех лунок 96-луночного планшета. Фетальная сыворотка крови КРС, отобранная для использования в клеточной культуре,



## СТРК 3501-2019

должна быть чистой не только от вируса, но и от нейтрализующих ВД антител. Для разрушения вируса ВД в загрязненной сыворотке термическая обработка (56 °С в течение 30-45 мин) недостаточно эффективна, поэтому применяется облучение с дозой не менее 25 кГр (2,5 Мрад). Тестирование доноров как на вирус, так и на антитело осуществляется индивидуально для каждой особи.

6.3.4 Светлый слой лейкоцитов, цельная кровь, отмытые лейкоциты или сыворотка подходят для выделения вируса от живых особей. Материнские антитела препятствуют выявлению вируса из сыворотки молодых телят. Суспензии из тканей павших особей готовятся стандартными методами. Подтверждение того, что КРС не является ХИ ВД, осуществляется исследованием проб крови. Тем не менее, некоторые быки, у которых ранее обнаруживалась хроническая инфекция яичек, после перенесенной острой инфекции, но которые больше не являются инфицированными, являются серопозитивными. Вирус может быть обнаружен в большинстве проб спермы таких быков. Для исключения ХИЯ, следует исследовать сперму всех серопозитивных быков. Пробы спермы, отобранные в течение нескольких недель, исследуются для подтверждения отсутствия у быков ХИЯ. После проверки проб, дальнейшее тестирование спермы серопозитивного быка не проводится. Свежеотобранная сперма, а также сперма содержащая множество других элементов, цитотоксична и разводится в соответствующей культуральной среде. В этой связи осуществляется контроль состояние клеток с помощью микроскопического исследования с интервалами во время инкубации.

6.3.5. В целях обеспечения максимальной чувствительности обнаружения стандартного вирусного препарата все должно быть оптимизировано. Все биологические компоненты, используемые для клеточной культуры, тестируются путем скрининга с подтверждением отсутствия вируса и антител ВД. Культуры клеток (как первичные, так и перевиваемые линии) регулярно тестируются для подтверждения поддержания максимальной восприимчивости к вирусной инфекции. В зависимости от типа образца и цели тестирования, для выделения вируса, потребуется один или несколько пассажей в клеточных культурах. ХИ животные идентифицируются путем скрининга крови или сыворотки за один пассаж. Сперму следует регулярно культивировать в течение трех пассажей и биологических продуктов, таких как фетальная сыворотка крови КРС до пяти раз (исходная инокуляция плюс четыре пассажа). Обычные способы выделения вируса используются с добавлением конечной стадии иммуоокрашивания (иммуофлуоресценция или, чаще, пероксидазное окрашивание) для выявления роста нецитопатогенного вируса. Таким образом, культуры в пробирках должны включать покровные стекла, в то время как культуры на микропланшетах могут фиксироваться и маркироваться непосредственно в планшете. Культуральный супернатант (надосадочная жидкость) из последнего пассажа подвергается скринингу с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

### **6.4 Иммунопероксидазный метод для массового скрининга и обнаружения вируса в образцах крови на микропланшетах**

#### 6.4.1 Аппаратура, материалы, реактивы

- Микротитрационные планшеты (96-луночные)
- Многоканальные дозаторы, одноканальные дозаторы, стерильные пластиковые наконечники
- Среда для культивирования клеток согласно паспорту клеточной линии
- Стандартное лабораторное оборудование для вирусной лаборатории (стерильный рабочий стол, инвертированный микроскоп, СО<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С), центрифуга, термоцентрифуга (80 °С), холодильник, морозильная камера (минус 20 °С, минус 70 °С)
- Полисорбата 20 (Tween 20), Полисорбат 80 (TWEEN 80) (ФСБТ) и 5% лошадиная

сыворотка

- Формальдегид
- 0,05 % водный раствор Полисорбата 20 (Tween 20)
- 1%-м желатин
- 3-амино-9-этилкарбазол
- ацетон
- дистиллированная вода
- тетрагидрохлорида диаминобензидин, тетрагидрат пербората натрия

#### 6.4.2 Процедура проведения теста

а) 10-25 мкл пробы сыворотки помещается в каждую из четырех лунок 96-луночного микропланшета для культуры тканей. Данная процедура повторяется для каждой пробы. Включаются известные положительные и отрицательные контроли.

б) 100 мкл клеточной суспензии в соответствующей концентрации (обычно около 150000 клеток/мл) в среде без фетальной сыворотки крови КРС добавляется во все лунки.

Примечание: сама проба выступает в качестве добавки для роста клеток.

При тестировании образцов, отличных от сыворотки, используется среда с 10% фетальной сыворотки крови КРС, не содержащей антител к пестивирусам жвачных животных.

в) Планшет инкубируется при 37°C в течение 4 дней либо в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>, либо с закрытой пластиной.

г) Каждая лунка исследуется под микроскопом на наличие признаков цитопатологии (цитопатогенный эффект) или признаков цитотоксичности.

д) Культуры на короткое время замораживаются при температуре минус 80 °С, и 50 мкл культурального супернатанта (надосадочной жидкости) переносятся в новые клеточные культуры, повторяя шаги 1-4.

е) Затем клетки фиксируются и окрашиваются одним из двух следующих способов:

1) Формальдегидом

а) Добавляется 200 мкл разведенного в пропорции 1/10 раствора формальдегида (приблизительно 3% концентрации) в планшет и планшет оставляется при температуре от 20 °С до 23 °С на 10 мин.

б) Содержимое планшета сбрасывается, а сам планшет промывается.

в) Планшет промывается 5 раз 0,05% водным раствором Полисорбата 20 (Tween 20) (допускается использование автоматической промывки микропланшетов с настройкой низких давления и скорости).

г) В каждую лунку вносится по 50 мкл противовирусных антител в соответствующем разведении (приготовленном в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 1 % желатина) и инкубируется в течение 60-90 мин при 37 °С.

д) Пластины промываются пять раз, как указано в подпункте в) настоящего пункта.

е) Разводится соответствующая конъюгированная с пероксидазой антисыворотка до оптимального разведения в 1%-м желатине/ФСБ (например, пероксидаза, конъюгированная кроличьими антимышиными иммуноглобулинами, когда противовирусное антитело является моноклональным у мыши). Оптимальная концентрация определяется для каждой партии конъюгата путем «шахматного» титрования по отношению к контрольным положительным и отрицательным образцам.

ж) В каждую лунку микропланшета добавляется 50 мкл разбавленного конъюгата пероксидазы и инкубируется в течение 90 мин при 37 °С.

и) Пластины промываются пять раз, как указано в подпункте в) настоящего пункта.

к) «Разрабатывается» планшет добавлением субстрата 3-амино-9-этилкарбазола (100 мкл на лунку) и экспозиции в течение 30 мин при температуре от 20 °С до 23 °С.

л) Добавляется 100 мкл ФСБ в каждую лунку, и каждый планшет закрывается

## СТРК 3501-2019

крышкой.

к) Лунки осматриваются с помощью светового микроскопа, начиная с лунок с отрицательными и положительными контрольными образцами. В неинфицированных клетках не должно быть заметного или минимального окрашивания (отрицательный контроль). Инфицированные клетки (положительный контроль) должны иметь красновато-коричневый цвет в цитоплазме.

2) Ацетоном

а) Планшет освобождается путем плавного переворачивания и промывания содержимого в фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

б) Клетки фиксируются следующим образом: планшет погружается в ванночку с 20 %-м раствором ацетона в ФСБ, сразу же высвобождается и затем переносится в свежую ванночку с 20 %-м раствором ацетона в ФСБ на 10 мин. Содержимое планшета тщательно сливается, и вся жидкость удаляется путем постукивания и промокания. Пластина тщательно высушивается в течение 3 часов при температуре от 25 до 30 °С (например, с использованием тепла от настольной лампы).

Примечание: сушка является частью процесса фиксации.

в) Зафиксированные клетки промываются путем добавления ФСБ во все лунки.

г) Лунки сливаются, и добавляется предварительно разведенные в ФСБ антитела ВД (50 мкл) во все лунки, содержащие 1 % Полисорбат 80 (TWEEN 80) (ФСБТ) и 5 % лошадиной сыворотки или 1 % желатина. (Лошадиная сыворотка или желатин могут быть добавлены для уменьшения неспецифического окрашивания).

д) Препарата инкубируется при 37°С в течение 15 мин.

е) Планшет освобождается от содержимого и трижды промывается в ФСБТ.

ж) Сливаются и добавляется соответствующая антивидовая сыворотка, конъюгированная с пероксидазой, в предварительно определенном разведении в ФСБТ (50 мкл на лунку) в течение 15 мин при 37 °С.

и) Освобождается планшет и трижды промывается в ФСБТ.

к) Ополаскивается планшет в дистиллированной воде. Вся жидкость должна вытечь из планшета.

л) Добавляется свежеприготовленный субстрат перекиси водорода с подходящим хромогеном, например, 3-амино-9-этилкарбазол. Допускается изготовление альтернативного субстрата, состоящего из 9 мг тетрагидрохлорида диаминобензидина и 6 мг тетрагидрата пербората натрия, растворенных в 15 мл ФСБ.

м) Планшет исследуется под микроскопом. Вирусопозитивные клетки показывают красно-коричневое цитоплазматическое окрашивание. Допускается использование альтернативных методов фиксации клеток, включающих использование тепла. Чтобы убедиться, что способность обнаруживать вирусный антиген не нарушена, их следует сначала изучить.

### **6.5 Пробирочный метод для исследования тканей или суспензий культур клеток**

6.5.1 Данный метод также может быть адаптирован для 24-луночных пластин. Требуется минимум 2, а предпочтительно 3 пассажа (включая первичную инокуляцию).

6.5.2 Аппаратура, материалы, реактивы

- Многоканальные дозаторы, одноканальные дозаторы, стерильные пластиковые наконечники

- Чувствительные клеточные культуры

- Среда для культивирования клеток согласно паспорту клеточной линии

- Стандартное лабораторное оборудование для вирусной лаборатории (стерильный

рабочий стол, инвертированный микроскоп, CO<sub>2</sub>-инкубатор (37° C), центрифуга, термоцентрифуга (80 °C), холодильник, морозильная камера (минус 20 °C, минус 70 °C).

- Пробирки
- Покровные стекла
- Ацетон

#### 6.5.3 Процедура проведения теста

1) Пробы ткани измельчаются с получением 10 % суспензии в культуральной среде. Затем центрифугируют для удаления мусора.

2) Культуры в пробирках с вновь конфлюэнтными или субконфлюэнтными монослоями чувствительных клеток КРС инокулируют 0,1 мл пробы. Культура клеток оставляется адсорбироваться на 1 час при 37°C.

3) Культура промывается 1 мл среды; затем сбрасывается и добавляется 1 мл культуральной поддерживающей среды.

4) Культура инкубируется в течение 4-5 дней при 37°C и исследуется под микроскопом на предмет наличия ЦПЭ или признаков цитотоксичности.

5) Затем культура замораживается и размораживается для пассажа на свежие культуры клеток для одного-двух пассажей и более (включая культуру, инокулированную для окончательного иммуноокрашивания). При последнем пассаже, после замораживания-размораживания, культуральная жидкость ткани собирается и переносится в микротитровальные плашки для культивирования и окрашивания методом иммунопероксидазы или иммунофлуоресцентным методом. Для иммунофлуоресценции покровные стекла в пробирках используются для поддержки культивируемых клеток. В конце периода культивирования покровные стекла удаляются, фиксируются в 100 % ацетоне и окрашиваются иммунофлуоресцентным конъюгатом к ВД. Покровные стекла осматриваются под флуоресцентным микроскопом на предмет диффузной, цитоплазматической флуоресценции, характерной для пестивирусов. Альтернативно, культуральный супернатант из последнего пассажа может быть подвергнут скринингу с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

### 6.6 Выделение вируса из семенной жидкости

6.6.1 Пробы, используемые для исследования, представляют собой разбавленную бычью сперму или свежееотобранную сперму. Пробы спермы транспортируются в лабораторию в жидком азоте или на сухом льду. Пробы хранятся в жидком азоте или при температуре ниже минус 70 °C (для длительного хранения) либо при 4 °C (для кратковременного хранения не более 12 дней). Лаборатория-получатель должна задокументировать условия получения образцов. Свежееотобранная сперма цитотоксична и должна быть предварительно разведена (например, 1/10 в сыворотке КРС без ВД) перед добавлением в клеточные культуры. Не менее 0,1 мл свежееотобранной спермы проверяется тремя пассажами в культуре клеток. Подготовка разбавленной спермы должна гарантировать исследование эквивалент не менее 0,1 мл необработанной спермы (например, минимум 1,0 мл разбавленной спермы). При фиксации токсичности требуется тестирование нескольких разбавленных проб для достижения объема, эквивалентного 0,1 мл свежееотобранной спермы (например, 5×1 мл пробы разбавленной спермы, разведенной в соотношении 1/5 для снижения токсичности).

#### 6.6.2 Аппаратура, материалы, реактивы

- Многоканальные дозаторы, одноканальные дозаторы, стерильные пластиковые наконечники
- Чувствительные клеточные культуры
- Среда для культивирования клеток согласно паспорту клеточной линии



## СТРК 3501-2019

- Стандартное лабораторное оборудование для вирусной лаборатории (стерильный рабочий стол, инвертированный микроскоп, CO<sub>2</sub>-инкубатор (37° С), центрифуга, термоцентрифуга (80 °С), холодильник, морозильная камера (минус 20° С, минус 70° С).

- Пробы для культур клеток, шестилуночный планшет
- Сыворотка КРС, содержащая антибиотики

### 6.6.3 Процедура проведения теста

Предлагаемый метод заключается в следующем:

а) Разводится 200 мкл свежесобранной спермы в 1,8 мл сыворотки КРС, содержащей антибиотики. Допускается использование сыворотки, используемой в качестве добавки к клеточной культуре, с подтверждением отсутствия в ней антител против вируса ВД.

б) Интенсивно перемешивается и оставляется на 30 мин при температуре от 20 °С до 23 °С.

в) Инокулируется 1 мл смеси спермы/сыворотки в монослой чувствительных клеток в пробирки для культивирования клеток или в шестилуночный планшет для культивирования тканей.

г) Инкубируются культуры в течение 1 часа при 37 °С.

д) Удаляется смесь, несколько раз промывается монослой поддерживающей средой, а затем в культуры добавляется новая поддерживающая среда.

е) Включается отрицательный и положительный контроль ВД в тесте. Следует соблюдать особую осторожность для недопущения случайного загрязнения испытуемых лунок положительным контрольным образцом. Положительный контрольный образец всегда вносится последним.

ж) Осуществляется микроскопическое наблюдение за планшетами для обеспечения отсутствия загрязнения и цитотоксичности. В результате инфекции ВД цитопатология не ожидается, но другие вирусы, такие как герпес вирус КРС (ВНВ-1), могут быть выделены непреднамеренно.

и) Через 5-7 дней культуры замораживаются при температуре около минус 70°С или ниже и размораживаются, осветляются центрифугированием, а супернатант используется для инокуляции свежих монослоев.

к) В конце второго пассажа супернатант из препарата, полученного замораживанием-размораживанием пассируется на культуры в подходящей системе для окрашивания иммунопероксидазой или выявления другого антигена путем ОТ-ПЦР в реальном времени после 5 дней культивирования. Наиболее эффективно осуществлять данную процедуру в 96-луночных микропланшетах. Проба считается отрицательной, если не обнаружено признаков вирусного антигена или РНК ВД.

## 6.7 Выявление нуклеиновой кислоты

6.7.1 Традиционная ОТ-ПЦР на основе геля применяется для обнаружения вирусной РНК ВД в диагностических целях. Мультиплексная ОТ-ПЦР используется для одновременной амплификации и типизации вируса из клеточной культуры или непосредственно из проб крови. Недостатками ОТ-ПЦР на гелиевой основе являются относительная трудоемкость, дороговизна и склонность к перекрестной контаминации. Данные недостатки снижаются при использовании зондовых или количественных методов ОТ-ПЦР в реальном времени. При любом из этих методов необходимо принимать строгие меры предосторожности для недопущения контаминации нуклеиновой кислоты в тест-системе и общих лабораторных зонах, где обрабатываются и готовятся пробы. Данные методы позволяют напрямую обнаруживать вирусную РНК из широкого спектра проб, включая сыворотку, цельную кровь, ткани, молоко и сперму. Высокая аналитическая

чувствительность позволяет применять стратегии для скрининга пулов отдельных проб или тестирования сборного молока. Используя этот подход, можно определить присутствие одного или нескольких животных с ХИ в стадах, содержащих несколько сотен коров. ОТ-ПЦР в режиме реального времени также используется для скрининга супернатанта культуры из конечного пассажа клеточных культур. В целом, ОТ-ПЦР в режиме реального времени обладает очень высокой чувствительностью и может применяться для скрининга биологических материалов, используемых для производства вакцин.

При интерпретации результатов учитывается, что обнаружение вирусной РНК само по себе не означает присутствие инфекционного вируса. ОТ-ПЦР в реальном времени на основе флуоресцентно-меченных ДНК-зондов допускается использовать для дифференциации пестивирусов. Праймеры для анализа отбираются в высококонсервативных областях генома, в идеале в 5-некодирующей области или в NS3 (ген р80). Чувствительный широко реактивный анализ рекомендуется для диагностических применений, потому встречается межвидовая передача различных пестивирусов. Для дальнейшей идентификации конкретного вируса, применяются специфические для пестивируса анализы. Необходимо оптимизировать все аспекты анализа ОТ-ПЦР в реальном времени, включая экстракцию и очистку нуклеиновых кислот. Необходимо определить оптимальные концентрации  $Mg_2$ , праймеров, зонда и полимеразы, а также параметры цикличности. Допускается использование полностью сформулированных и оптимизированных «готовых к использованию» «мастер-миксов», требующих только добавления оптимизированных концентраций праймеров и зонда. Оптимизированные условия цикличности рекомендуются для конкретного мастер-микса. Конкретные продукты должны быть оценены, чтобы определить оптимальный набор для конкретного типа пробы и требуется ли какая-либо предварительная обработка пробы. Для проб цельной крови важен тип антикоагулянта и объем крови в пробирке. С пробами крови, обработанными гепарином, встречается больше проблем с ингибиторами реакции ПЦР, чем при использовании ЭДТК. Эти различия также усугубляются, если в пробирке не содержится рекомендуемый объем крови, что увеличивает концентрацию антикоагулянта в пробе. Чтобы определить возможные ложноотрицательные результаты, необходимо добавление экзогенной («внутренний контроль») матрицы РНК в образец до выделения РНК. Путем включения праймеров и зондов для ПЦР, специфичных для экзогенной последовательности, можно отслеживать эффективность как выделения РНК, так и наличия любых ингибиторов ПЦР. Включение внутреннего контроля особенно необходимо при тестировании спермы и цельной крови. При широком использовании внутреннего контроля необходимо провести тестирование, чтобы убедиться, что ПЦР-амплификация внутреннего контроля не конкурирует с диагностической ПЦР и, следовательно, снижает аналитическую чувствительность.

6.7.2 При наличии подозрений наличия в пробе веществ, отрицательно влияющих либо на эффективность выделения РНК, либо на анализ ОТ-ПЦР в реальном времени, осуществляется умеренное разведение образца в физиологическом растворе, среде для культивирования клеток или буферном растворе. Проба спермы разводится в соотношении 1/4 и цельной крови 1/10. Поскольку ОТ-ПЦР в реальном времени обладает чрезвычайно высокой аналитической чувствительностью, разведение пробы редко оказывает существенное влияние на способность анализа обнаруживать вирусную РНК при её наличии.

## СТРК 3501-2019

### 6.8 Использование полимеразной цепной реакции в реальном времени для обнаружения вируса ВД в сперме

6.8.1 ОТ-ПЦР в реальном времени используется для скрининга образцов спермы в целях подтверждения свободы от ВД. ОТ-ПЦР в реальном времени использует пару специфичных последовательностей праймеров для амплификации ДНК-мишени и 5'-нуклеазный олигонуклеотид при обнаружении амплифицированных продуктов. Олигонуклеотид - это отдельный, специфичный для последовательности олигонуклеотид, меченный двумя разными флуорофорами. Этот пан-пестивирусный анализ ОТ-ПЦР в реальном времени предназначен для обнаружения вирусной ДНК всех штаммов ВД1 и ВД2, а также вируса пограничных заболеваний, классической чумы свиней и большинства атипичных пестивирусов. Анализ селективно амплифицирует последовательность из 208 пар оснований 5'-нетранслируемой области генома пестивируса. Детали праймеров и зондов приведены в протоколе, изложенном ниже.

#### 6.8.2 Подготовка проб, оборудование и реагенты

а) Пробы, используемые для теста, представляют собой разведенную сперму КРС либо свежесобранную сперму. Если образцы тестируются только с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, допускается использование охлажденных проб, но при поступлении в лабораторию данные пробы должны быть низкой температуры. При отсутствии возможности обеспечения непрерывной холодной цепи или если производится изоляция вируса, пробы спермы следует транспортировать в лабораторию в жидком азоте или на сухом льду. В лаборатории пробы следует хранить в жидком азоте или при температуре ниже  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (для длительного хранения) либо при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (для кратковременного хранения до 7 дней). Примечание: образцы для выделения вируса не следует хранить при температуре  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  более 1-2 дней.

б) При использовании ОТ-ПЦР в реальном времени допускается использование меньших объемов спермы. Должны быть обработаны не менее трех пробирок (минимальный объем каждой - 250 мкл) из каждой партии сбора спермы. Сперма в трех пробирках должна быть объединена и тщательно перемешана перед взятием образца для экстракции нуклеиновой кислоты.

в) Для проведения анализа требуется тест-система для обнаружения ПЦР в реальном времени и соответствующее программное обеспечение для анализа данных. Для проведения данного теста необходимо дополнительное оборудование: микроцентрифуга, охлаждающий блок, микровстряхиватель и микропипетки. ОТ-ПЦР в реальном времени способны обнаруживать очень небольшие количества целевых молекул нуклеиновой кислоты. В этой связи необходимы соответствующие меры, для избегания контаминации, включая отдельные и физически разделенные «чистые» участки для приготовления реагента (где пробы или материалы не используются для ПЦР), выделенная зона для пробоподготовки и изолированная зона для термоциклера ПЦР и соответствующего оборудования. Для каждой зоны должны быть выделены реагенты и оборудование. Не менее одной отрицательной пробы обрабатывается параллельно в целях контроля возможности низкого уровня контаминации. Источниками контаминации могут быть положительные образцы или перекрестная контаминация продуктами ПЦР от предыдущих проб).

ОТ-ПЦР-анализ в реальном времени включает две отдельные процедуры:

а) Первая процедура – экстракция РНК ВД из спермы с использованием соответствующего утвержденного метода экстракции нуклеиновых кислот. Рекомендуются тест-системы, использующие магнитные шарики для захвата и очистки нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, чтобы шарики обрабатывались полуавтоматической системой обработки магнитных частиц.



б) Вторая процедура - анализ ОТ-ПЦР выделенной матрицы РНК в системе ОТ-ПЦР в реальном времени.

В различных методах и видах ПЦР могут меняться некоторые параметры и процедуры, ввиду того, что поставляемые тест-системы обновляются и дополняются производителями в зависимости от серии тест-системы.

### 6.9 Экстракция РНК

РНК или общая нуклеиновая кислота экстрагируется из сборной пробы спермы (три пробирки, собранные одновременно у одного и того же животного). Перед экстракцией необходимо развести пул проб спермы 1/4 в фосфатно-буферном желатиновом солевом растворе или аналогичном забуференном растворе. Экстракция РНК завершается путем добавления 50 мкл разведенного пула проб в буфер для лизиса. Удовлетворительные результаты получают путем добавления 25 мкл неразбавленного пула образца в буфер для лизиса.

### 6.10 Процедура анализа ОТ-ПЦР в реальном времени

а) Реакционная смесь: Существует ряд наборов для амплификации ПЦР в реальном времени, доступных из различных источников, и определенные выбранные наборы должны быть совместимы с выбранной платформой ПЦР в реальном времени.

б) Поставка и хранение реагентов: При применении и хранении набора должны соблюдаться инструкции производителя. Рабочие исходные растворы для праймеров и зонда готовятся с использованием воды без нуклеазы в концентрации 20 мкМ и 3 мкМ соответственно. Исходные растворы хранятся при минус 20 °С, а раствор зонда хранится при отсутствии доступа света. Допускается приготовление аликвоты для одноразового или ограниченного использования, чтобы ограничить замораживание-размораживание праймеров и зондов и продлить срок их хранения.

в) Праймеры и последовательности зондов

Первичный: ВПБ 190-F 5'-GRA-GTC-GTC-ART-GGT-TCG-AC.

Обратный: V326 5'-TCA-ACT-CCA-TGT-GCC-ATG-TAC.

Зонд: TQ-pesti5'-FAM-TGC-YAY-GTG-GAC-GAG-GGC-ATG-C-TAMRA-3'.

г) Приготовление реакционных смесей

Реакционные смеси для ПЦР готовятся в отдельной комнате, изолированной от других операций ПЦР и обработки образцов. Для каждого теста ПЦР должны быть включены соответствующие контрольные образцы. Минимально включаются: нематричный контроль (НМК), соответствующий отрицательный контроль (ОК) и два положительных контроля (ПК1, ПК2). Положительные и отрицательные контроли включаются во все этапы анализа, начиная с экстракции и заканчивая добавлением НМК после завершения экстракции. ПЦР-амплификации проводят в объеме 25 мкл. Данный протокол основан на использовании 96-луночной системы на основе микропланшетов, но также подходят и другие варианты с использованием микропробирок. Каждая лунка планшета для ПЦР должна содержать 20 мкл реакционной смеси и 5 мкл пробы следующим образом:

12,5 мкл буфера 2 × RT - из коммерческого набора;

1 мкл ВПБ190-F Прямой праймер (20 мкМ);

1 мкл обратного праймера V326 (20 мкМ);

1 мкл TQ-пести зонд (3 мкМ);

2 мкл тРНК (40 нг/мкл);

1,5 мкл воды;

## СТРК 3501-2019

- 1 мкл 25 × ферментная смесь;
- 5 мкл пробы (или контроли - НМК, ОК, ПК1, ПК2)
- д) Выбор контролей

НМК: обычно состоит из тРНК в свободной от нуклеазы воде, которая добавляется вместо пробы при проведении реакции ПЦР.

ОК: Используется ФСБ или аналогичный буфер. Контрольные образцы для тестирования проб спермы должны быть отрицательной спермой от серонегативных быков. При этом используемый анализ проверяется с отрицательными и положительными образцами для подтверждения его надежной экстракции и амплификации со спермой.

ПК: есть два положительных контроля (ПК1 = умеренный - [пороговый цикл (Ct) 29-32] и ПК2 = слабый [пороговый цикл (Ct) 32-35] положительный). В качестве положительного контроля предпочтительна положительная сперма от естественно зараженных быков. Сперма, полученная от быка с ХИ, не считается подходящей, потому что вирусные нагрузки обычно очень высоки и не дают надежного указания на какое-либо умеренное снижение эффективности экстракции или анализа. В качестве альтернативы допускается использование отрицательной спермы с добавлением определенного количества вируса ВД. Если другие образцы используются в качестве обычного ПК, то все процессы экстракции и ПЦР-анализ должны быть тщательно проверены с использованием положительной спермы от быков с ХИЯ или от быков, перенесших острую инфекцию. Если эти образцы недоступны, а указанные образцы используются для целей валидации, следует включить ряд образцов с очень низким уровнем вируса. На ежедневной основе включение экзогенного контроля в каждый тестируемый образец в значительной степени компенсирует отсутствие положительной спермы в качестве контроля и дает дополнительные преимущества путем мониторинга эффективности анализа для каждого отдельного образца. Образцы положительного контроля готовятся во избежание перекрестной контаминации из запасов вируса с высоким титром, и готовятся заранее и замораживаются в «готовой к употреблению» концентрации в «одноразовом» объеме.

е) Извлеченные образцы добавляются в смесь для ПЦР в отдельном помещении. Контроли добавляются последними в следующем порядке: НМК, отрицательный, а затем два положительных контроля.

- ж) ПЦР в реальном времени.

Пластина или пробирки для ПЦР помещаются в систему для обнаружения ПЦР в реальном времени в отдельном, специально отведенном помещении для ПЦР.

Некоторые смеси имеют одинаковые условия реакции, которые подходят для многих различных анализов. Например, система для обнаружения ПЦР запрограммирована для теста следующим образом:

- 1 × 48 °C 10 мин;
- 1 × 95 °C 10 мин;
- 45 × (95 °C 15 секунд, 60 °C 1 мина)

- и) Анализ данных ПЦР в реальном времени

Программное обеспечение настраивается на автоматическую настройку результатов путем компенсации любого фонового сигнала, а пороговый уровень устанавливается в соответствии с инструкциями производителя для выбранного используемого программного обеспечения. В этом случае пороговое значение устанавливается равным 0,05.

- к) Интерпретация результатов

Тестовые контроли - все контроли должны давать ожидаемые результаты, когда положительные контроли ПК1 и ПК2 попадают в заданный диапазон, у ОК и нематричного контроля НМК не должно превышать порогового значения.

Испытательные образцы:

1) Положительный результат. Любая выборка, у которой пороговое значение цикла меньше 40, считается положительной.

2) Отрицательный результат. Любой образец, который не показал пороговое значение цикла, считается отрицательным. Однако, прежде чем сообщать об отрицательном результате образца, следует проверить эффективность экзогенного внутреннего контроля и показать результат в пределах допустимого диапазона для этого контроля (например, значение порогового цикла не более чем на 2-3 единицы выше чем НМК).

### **6.11 Иммуноферментный анализ для выявления антигена**

Обнаружение антигена с помощью ИФА является распространенным методом для выявления отдельных ХИ животных. Этот метод не предназначен для выявления остро инфицированных животных. Метод не предназначен для скрининга спермы или биологических материалов, используемых при производстве вакцин. Большинство наборов основано на принципе сэндвич-ИФА, когда захватывающее антитело связано с твердой фазой, а детекторное антитело конъюгировано меткой, такой как пероксидаза. Использование системой обнаружения биотина и стрептавидина в стадии амплификации применяется для повышения чувствительности анализа. Существуют моноклональные и поликлональные системы. Тест измеряет антиген ВД (NS2-3 или ERNS) в лизатах лейкоцитов периферической крови; новое поколение антигензахватывающих ИФА (ERNS-захватывающий ИФА) способно обнаруживать антиген ВД в крови, а также в образцах плазмы или сыворотки.

NS2-3-захватывающий ИФА является менее эффективным для исследования молодых телят, у которых с молозивом поступили материнские антитела ВД. ОТ-ПЦР в режиме реального времени, является наиболее чувствительным методом обнаружения в данном случае, ERNS-захватывающий ИФА также является чувствительным и надежным тестом, при использовании образцов биопсии кожи (ушной).

### **6.12 Иммуногистохимия**

Иммунные методы, меченные ферментом, используются для обнаружения антигена ВД в срезах тканей, особенно там, где доступны подходящие МАт (моноклональные антитела). Однако эти анализы не подходят для сертификации животных при международной торговле. Все используемые реагенты и процедуры были полностью валидированы для исключения неспецифической реактивности. При исследовании крупного рогатого скота можно использовать практически пробу из любой ткани, но более эффективно использование лимфатических узлов, щитовидной железы, кожи, мозга, сычуга и плаценты.

## **7 Серологические тесты**

7.1 Антитела к ВД выявляются в сыворотке крупного рогатого скота с помощью стандартных методов ВН или ИФА. Серология используется для определения уровня иммунитета, для обнаружения присутствия животных с ХИ в стаде, для исследования репродуктивных заболеваний и возможного присутствия вируса ВД, для определения серологического статуса быков, используемых для сбора спермы и для определения животных, переболевших инфекцией. ИФА на антитела в образцах молока определяет статус поголовья по ВД. Высокое значение ИФА (0,8 или более единиц абсорбции) в невакцинированном стаде указывает на высокую вероятность того, что стадо

## СТРК 3501-2019

подвергалось воздействию ВД, из-за присутствия одного или нескольких постоянно зараженных животных. Очень низкое или отрицательное значение ( $\leq 0,2$ ) указывает на маловероятное присутствие вирусных животных. Однако значения ИФА не всегда являются надежным индикатором присутствия ХИ животных в фермах так как влияют многие факторы такие как применение вакцины, присутствие вирусного антигена в общем молоке и т.д. Определение статуса антител у небольшого количества молодняка (9-18 месяцев) использовалось в качестве индикатора недавней передачи ВД в стаде, но этот подход зависит от степени контакта между различными группами животных в стаде и потенциальной подверженности воздействию соседних стад. Тесты на ВН чаще используются в целях регулирования (например, тестирование доноров спермы), в то время как ИФА используется для диагностических целей. Контрольные положительные и отрицательные стандартные сыворотки должны быть включены в каждый тест ИФА и ВН. Они должны давать результаты в заданных пределах, чтобы исследование считалось действительным. При постановке реакции ВН «контроль сыворотки» должен быть включен в качестве контроля токсичности пробы при каждом исследовании.

### 7.2 Реакция нейтрализации вируса

7.2.1 Низкие уровни антител к вирусу ВД типа 2 могут быть не обнаружены с помощью реакции нейтрализации, в котором используется штамм вируса типа 1, и наоборот. Важно чтобы в тесте использовались и вирус ВД типа 1 и типа 2, а не один, который, по мнению диагноста присутствует, поскольку это может привести к занижению результатов. Поскольку это облегчает учет теста используется высоко цитопатические, лабораторно адаптированные штаммы ВД для тестов реакции ВН. Существует два широко используемых цитопатогенного штамма - «Oregon C24V» и «NADL». Однако в настоящее время доступны методы иммунной метки, которые позволяют легко обнаруживать рост или нейтрализацию нецитопатогенных штаммов там, где это считается желательным, особенно для поддержки местного штамма вируса.

#### 7.2.2 Аппаратура, материалы, реактивы

- Микротитрационные планшеты (96-луночные)
- Многоканальные дозаторы, одноканальные дозаторы, стерильные пластиковые наконечники
- цитопатогенный штамм ВД
- Среда для культивирования клеток согласно паспорту клеточной линии
- Стандартное лабораторное оборудование для вирусной лаборатории (стерильный рабочий стол, инвертированный микроскоп, CO<sub>2</sub>-инкубатор (37° С), центрифуга, термоцентрифуга (80 °С), холодильник, морозильная камера (минус 20° С, минус 70° С), термошейкер (37° С)

#### 7.2.3 Процедура проведения теста

а) Тестируемые сыворотки инактивируются нагреванием в течение 30 мин при 56 °С.

б) Начиная с разведения 1/4, делая серийные двукратные разведения тестируемых сывороток в 96-луночном микротитровальном планшете для клеточных культур с плоским дном, с использованием среды для культивирования клеток в качестве разбавителя. Для каждого образца используются три или четыре лунки при каждом разведении в зависимости от требуемой степени точности. При каждом разведении сыворотки, для каждой пробы одну лунку оставляют без вируса, для отслеживаемости признака токсичности пробы, которая может имитировать вирусную цитопатологию или

мешать репликации вируса. Контрольные положительные и отрицательные сыворотки должны быть включены в каждую серию тестов.

в) В каждую лунку добавляется равный объем (например, 50 мкл) запаса цитопатогенного штамма ВД, содержащего 100 ЦПД<sub>50</sub> (50 %) инфекционной дозы для культуры ткани. В некоторых запасных лунках также проводится обратное титрование запаса цитопатогенного штамма для проверки активности вируса (допустимые пределы 30-300 ЦПД<sub>50</sub>).

г) Планшет инкубируется в течение 1 часа при 37° С.

д) Колба с подходящими клетками (например, носовые пазухи КРС, семенники КРС) трипсинизируются, и концентрация клеток доводится до  $1,5 \times 10^5$ /мл 100 мкл клеточной суспензии вносятся в каждую лунку планшета для микротитрования.

е) Планшет инкубируется при 37 °С в течение 4-5 дней в среде с 5 % CO<sub>2</sub> или в закрытой пластине.

ж) Лунки микроскопируются на предмет цитопатогенного эффекта (ЦПЭ) или фиксируются и окрашиваются иммунопероксидазным окрашиванием с использованием подходящего моноклонального антитела. Титром ВН каждой сыворотки считается разведение, при котором вирус нейтрализуется на 50%. Это можно рассчитать методами Спирмена-Кербера или Рида Мюнха. У серонегативного животного не отсутствует нейтрализация при самом низком разведении (1/4), что эквивалентно окончательному разведению 1/8. Для точного сравнения титров антител и, в частности, для демонстрации значительных (более чем четырехкратных) изменений титра, образцы тестируются параллельно в одном и том же тесте.

### 7.3 Иммуноферментный анализ

7.3.1 Используются как непрямые, так и блокирующие виды ИФА. Как и в случае реакции нейтрализации вируса, ИФА сконфигурированные с использованием антигена одного генотипа вируса ВД, могут не эффективно обнаруживать антитела, индуцированные другим генотипом. Поэтому следует выбирать наборы с учётом их способности обнаруживать антитела к спектру генотипов и штаммов, циркулирующих в местности, где будет проводиться тест.

В различных методах и видах ИФА могут меняться некоторые параметры и процедуры, ввиду того, что поставляемые тест-системы обновляются и дополняются производителями в зависимости от серии тест-системы.

6.3.2 Основная трудность в настройке теста заключается в приготовлении вирусного антигена с достаточной эффективностью. Вирус должен быть выращен в оптимальных условиях культивирования с использованием высоко перmissive типа клеток. Любая сыворотка, используемая в среде, не должна ингибировать рост ВД. Оптимальное время для сбора клеток должно быть определено экспериментально для индивидуальной системы культивирования. Вирус может быть концентрирован и очищен центрифугированием в градиенте плотности. Альтернативно, мощный антиген может быть получен путем обработки инфицированных клеточных культур детергентами, такими как Nonidet P40, N-деcanoил-М-метилглюкамин (Mega 10), Triton X-100 или 1-октилбета-D-глюкопиранозид (ОГП).

7.3.3 Оборудование и реагенты

- Микротитрационные планшеты
- Многоканальные дозаторы, одноканальные дозаторы, стерильные пластиковые наконечники

- Стандартное лабораторное оборудование для вирусной лаборатории (стерильный рабочий стол, инвертированный микроскоп, CO<sub>2</sub>-инкубатор (37° С), центрифуга,





## СТРК 3501-2019

термоцентрифуга (80° С), холодильник, морозильная камера (минус 20° С, минус 70° С), термошейкер (37° С)

- Аппарат для промывание микропланшетов
- Вортекс
- Роликовые культуры вторичных клеток семенника теленка
- 2 % ОВП
- Бикарбонатный буфер
- 0,05 % Полисорбат 20 (Твин20) или Полисорбат 80 (Твин 80)
- Разбавитель для сыворотки (0,5 М NaCl; 0,01 М фосфатный буфер; 0,05 % Полисорбат 20 (Твин 20); 0,001 М этилендиаминтетрауксусная кислота; 1 % поливинилпирролидон, рН 7,2)
- Перекись водорода/тетраметилбензидин
- Серная кислота
- Ридер для планшета ИФА

### 7.3.4 Процедура проведения теста

а) Роликовые культуры вторичных клеток семенника теленка с высокой множественностью инфекции (около одной), инокулируются штаммом ВД Орегон С24V, покрывается бессывороточной средой и инкубируется в течение 24 часов при 37° С.

б) Клетки соскребаются и гранулируются. Надосадочная среда сбрасывается. Осадок обрабатывается двумя объемами 2 % ОВП в ФСБ в течение 15 мин при 4° С и центрифугируется для удаления клеточного дебриса. Супернатантный антиген хранится небольшими аликвотами при минус 70° С или лиофилизируется. Неинфицированные клетки обрабатываются параллельно, для получения контрольного антигена.

в) Антиген разбавляется до заданного разведения в 0,05 М бикарбонатном буфере, рН 9,6. Чередующиеся ряды микротитрационного планшета ИФА покрывается вирусом и контрольными антигенами в течении ночи при 4° С. Перед использованием в тесте планшеты промываются в ФСБ с 0,05 % Полисорбат 20 (Твин 20) или Полисорбат 80 (Твин 80) (ФСБТ).

г) Испытуемые сыворотки разводятся в соотношении 1/50 разбавителем для сыворотки (0,5 М NaCl; 0,01 М фосфатный буфер; 0,05 % Полисорбат 20 (Твин 20); 0,001 М этилендиаминтетрауксусная кислота; 1 % поливинилпирролидон, рН 7,2) и добавляются к вирусам и в контрольные лунки, лунки накрываются и инкубируются в течение 1 часа при 37° С. Планшеты промываются в ФСБТ пять раз.

д) Конъюгат кроличьей анти-бычьей IgG-пероксидазы добавляется в определенном разведении (в разбавителе для сыворотки) в течение 1 часа при 37° С, затем планшеты снова промываются пять раз в ФСБТ.

е) Добавляется подходящий ферментный субстрат, такой как перекись водорода/тетраметилбензидин. После развития окраски реакция останавливается серной кислотой и измеряется оптическая плотность на ридере для планшета ИФА. Значение, полученное с контрольным антигеном, вычитается из значения испытуемой пробы, для получения чистой величины поглощения для каждой сыворотки.

ж) Рекомендуются преобразовать значения чистой абсорбции в пробе: положительное соотношение (или процент позитивности) путём деления чистой абсорбции на чистую абсорбцию стандартной положительной сыворотки с абсорбцией около 1,0.

Окрашивание раствора в лунках свидетельствует о количественном наличии или отсутствии в исследуемых образцах антител специфических к вирусу диареи.



---

**УДК 636.2**

**МКС 65.020.30 (NEQ)**

**Ключевые слова:** вирусная диарея, вирусная диарея крупного рогатого скота, лабораторная диагностика, идентификация агента.

---





БИН: 230640017171. Заказ №F-174211102023 от 11.10.2023. Пользователь: ТОО "ТОО ОУМРВЕТ"

СТ РК 3501-2019 выдан РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии». Безвозмездное использование только для резидентов Республики Казахстан





Басуға \_\_\_\_\_ ж. Қол қойылды. Пішімі 60x84 1/16  
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «Kz Times New Roman»,  
«Times New Roman»

Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы \_\_\_\_\_ дана. Тапсырыс \_\_\_\_\_

---

«Қазакстан стандарттау және сертификаттау институты»  
республикалық мемлекеттік кәсіпорны  
010000, Нұр-Сұлтан қаласы, Мәңгілік Ел даңғылы, 11 үй  
«Эталон орталығы» ғимараты  
Тел.: 8(7172) 27-08-14, 44-64-50