

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вируссодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 1 из 10
Версия № 02		Дата введения: 30.11.2017
Причина пересмотра: Актуализация		

Утверждение Процедуры	Должность	Ф.И.О.	Подпись	Дата
Разработал	Начальник отдела ГКМ	Бальшев В.М.		«17» 11 2017г.
Разработал	Младший научный сотрудник	Иматдинов А.Р.		«17» 11 2017г.
Согласовал	Главный научный сотрудник	Юрков С.Г.		«17» 11 2017г.
Согласовал	Начальник ОСМК	Бобкова Т.Е.		«17» 11 2017г.
Согласовал	Заместитель директора по диагностическим исследованиям	Егорова И.Ю.		«17» 11 2017г.
Согласовал	Заместитель директора по НИР	Малоголовкин А.С.		«17» 11 2017г.
Утвердил	Директор ФГБНУ ФИЦВиМ	Колбасов Д.В.		«17» 11 2017г.

1. Цель

Установить требования к получению и условиям хранения нативной вируссодержащей крови для криоконсервирования при минус (40 – 50) °С.

2. Область применения

Данная СОП распространяется на сотрудников лабораторий (отделов), участвующих в процессе получения нативной вируссодержащей крови, полученной на основе вируса АЧС, для криоконсервирования и последующего её хранения.

3. Распределение ответственности

Ответственными за организацию и координацию работ, регламентированных настоящей СОП, является заведующий лабораторией (отделом) и ответственный исполнитель.

Получение нативной вируссодержащей крови осуществляют научные сотрудники в паре с лаборантом-исследователем, имеющие высшее ветеринарное, биологическое или медицинское образование, прошедшие обучение на специализированных курсах по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности, сдавшие зачет по биологической безопасности и допущенные к работам приказом директора ФГБНУ ФИЦВиМ.

Техническое обеспечение работ (стерилизация и обеззараживание посуды, инструментов, подготовка боксовых помещений, приготовление дезинфицирующих растворов) проводят лаборанты-исследователи.

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вируссодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 2 из 10

4. Требования безопасности

4.1. Работу проводят согласно требованиям СП 1.3.2322-08.

4.2. Безопасность труда при работе с биологическими объектами должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

4.3. Соблюдение ветеринарно-санитарного режима должно соответствовать Инструкции по ветеринарно-санитарному и противоэпидемическому режиму работы при проведении научно исследовательских, экспериментальных и диагностических исследований с микроорганизмами III и IV групп патогенности в отделе ГКМ.

4.4. Соблюдение техники безопасности должно соответствовать Инструкции по охране труда для сотрудников подразделений ГНУ ВНИИВВиМ.

5. Процедура

5.1. Общие положения

5.1.1. Все работы с вирусом АЧС проводят в боксовых помещениях в шкафах с ламинарным вертикальным потоком II класса, а работу с животными - в виварных боксах с соблюдением принципа парности.

5.1.2. Персонал, участвующий в работе по получению вируссодержащей крови должен работать в спецодежде (халат одноразовый типа «Тувек» фирмы Du Pont, халат медицинский, чепчик, тапочки, сапоги резиновые, маски медицинские, перчатки анатомические) в соответствии с требованиями Инструкции по ветеринарно-санитарному и противоэпидемическому режиму работы при проведении научно исследовательских, экспериментальных и диагностических исследований с микроорганизмами III и IV групп патогенности в отделе ГКМ.

5.1.3. Подготовку боксового помещения, в котором проводятся работы с ПБА, проводят до начала работ, обеззараживание - по их окончании в соответствии с требованиями Инструкции по ветеринарно-санитарному и противоэпидемическому режиму работы при проведении научно исследовательских, экспериментальных и диагностических исследований с микроорганизмами III и IV групп патогенности в отделе ГКМ.

5.1.4. Перед проведением работ готовят рабочий (5 %) и аварийный (10 %) растворы хлорамина Б по СОП ОО-00470. Срок годности растворов 10 суток. Контроль концентрации АДВ в рабочих и аварийных растворах проводят при помощи химических индикаторов серии ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН.

5.1.5. Растворы и среды допускают к использованию в работе только после всех необходимых видов технологического контроля (проверка на токсичность, ростовые свойства, стерильность). Питательную среду перед использованием просматривают на свету для оценки герметичности укупорки флаконов, прозрачности, отсутствия посторонних включений. Горловины

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вируссодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 3 из 10

культуральных сосудов с растворами, средами и др. препаратами фламбируют спиртом.

5.2. Оборудование и инвентарь:

- бак металлический для отходов – 3 шт.;
- бикс для стерилизации – 1 шт.;
- бусы стеклянные для дефибрирования вируссодержащей крови;
- вакуумные пробирки (9,0 см³) с ЭДТА – 3 шт.;
- ведро – 2 шт.;
- ветошь для мытья пола – 2 м;
- помповый опрыскиватель типа ORION на 9 литров – 1 шт.;
- горелка газовая, ГОСТ 5034-61 – 1 шт.;
- дозатор пипеточный 8-канальный автоматический 30 - 300 мкл;
- дозатор пипеточный одноканальный автоматический на 100 - 1000 мкл – 1 шт.;
- дозатор пипеточный одноканальный автоматический на 20 -200 мкл;
- зажим для пакета для деструкции – 1 шт.;
- иглы для вакуумной системы отбора крови – 3 шт.;
- инвертированный световой микроскоп – 1 шт.;
- индикатор МедИс-132/20 – 5 шт.;
- корнцанги, пинцеты, ГОСТ 21241 – 1 шт.;
- криопробирки полипропиленовые производства фирмы Corning (Мексика) или других производителей на 2,0 и 4,0 см³;
- лопата совковая – 3 шт.;
- маркер перманентный – 1 шт.;
- маски медицинские, ТУ 9398-020-18603495 – 67 шт.;
- мыло антибактериальное жидкое – 50 мл;
- наконечники универсальные для дозаторов объемом 200, 1000 мкл;
- низкотемпературный холодильник с температурным режимом (минус 40 – 50) °С;
- одноразовые медицинские головные уборы, ГОСТ 23134 – 4 шт.;
- пакет для деструкции – 1 шт.;
- переходник для вакуумной системы отбора крови – 3 шт.;
- перчатки анатомические, № 7-10, ТУ 33/3-52 – 70 шт.;
- перчатки латексные медицинские двукратного хлорирования одноразовые – 6 шт.;
- планшеты культуральные пластиковые 12, 24, 48 и 96 -луночные;
- полотенце бумажное рулонное – 0,2 шт.;
- полый нож – 1 шт.;
- пробки резиновые № 14,5 – 10 шт.;
- пробки резиновые № 24 – 5 шт.;
- резиновые пробки №№ 14, 24, ГОСТ 7852-76;

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вируссодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 4 из 10

- ручка шариковая – 1 шт.;
- сапоги резиновые 40 - 45 размер – 3 пары;
- скребок (мотыга) – 3 шт.;
- CO₂-инкубатор;
- спички – 1 кор.;
- стерилизатор огневой П-40 – 1 шт.;
- тележка – 1 шт.;
- термометры – 3 шт.;
- термохимические тесты МедИС-132/20 – 4 шт.;
- флаконы культуральные пластиковые на 25,0 см²;
- флаконы стеклянные объемом 100 см³ – 4 шт.;
- флаконы стеклянные пенициллиновые объемом 10 см³ – 10 шт.;
- халаты медицинские, ГОСТ 24760 – 2 шт.;
- халаты разовые для работы в виварных боксах типа «Tyvek» фирмы Du Pont 50 -56 размер или аналог – 34 шт.;
- химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН – 6 шт.;
- холодильник бытовой с температурным режимом (4 ± 2) °С;
- цилиндры измерительные – 2 шт.;
- швабра с черенком – 2 шт.;
- шкаф ламинарный – 1 шт.;
- шприц стеклянный типа «Рекорд» объёмом 20 см³ – 3 шт.;
- шприцы одноразовые пластиковые объёмом 2 см³ – 3 шт.;
- шприцы одноразовые пластиковые объёмом 20 см³ – 6 шт.;
- щетка гигиеническая – 1 шт.

5.2. Животные, сырье и материалы:

- антибиотики (пенициллин, стрептомицин, гентамицин);
- средство противопаразитарное Альбен таблетки (Tabulettae Albenum) или аналог – 3 таблетки;
- бумага пергаментная – 50г;
- комбикорм для свиней – 82 кг;
- мясокостная мука – 0,77 кг;
- порошок стиральный "Зифа" – 0,3 кг;
- вата гигроскопическая, ГОСТ 5556-81 – 100 г;
- вирусный материал;
- гепарин (раствор для внутривенного и подкожного введения производства Московского эндокринного завода или других производителей) – 0,6 мл;
- культуры клеток КМС или ЛС, полученные из Коллекции культур клеток лаборатории Лекарственные средства для животных:
- препараты группы фторхинолонов (пепфлоксацин, ципрофлоксацин и др.);

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вирусосодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 5 из 10

- свиньи крупной белой или другой породы ж.м. 25 – 35 кг, полученные из отдела подготовки подопытных животных (ОППЖ) ФГБНУ ФИЦВиМ, не привитые против КЧС – 3 гол.;
- спирт этиловый, ГОСТ 5962-67 – 200 мл;
- сыворотка крови свиньи;
- физиологический раствор рН 7,0 – 7,4 – 100 мл;
- хлорамин Б – 4,65 кг.

5.3. Подготовка боксовых помещений и посуды к работе

Подготовку боксовых помещений к работе проводят по СОП АД-00003. Учет ресурса работы бактерицидных ламп, замеров показателей микроклимата в лабораторных помещениях, проведения текущих и генеральных уборок регистрируют в журналах соответствующих форм (Журнал учета работы бактерицидных облучателей, Журнал учета проведения текущих и генеральных уборок, Журнал приготовления дезрастворов, Журнал учета температуры и влажности в боксовых помещениях, Журнал учета температуры в термостатах, Журнал учета температуры в холодильниках). Подготовку посуды к работе проводят по СОП АД-00167.

5.4. Требования к животным

Для получения крови, содержащей вирус АЧС, используют свиней крупной белой или другой породы живой массой 25 – 35 кг. Клинически здоровых животных перед заражением предварительно дегельминтизируют и карантинируют в течение 14 суток с ежедневной термометрией тела. Для получения вирусосодержащей крови допускается использование вакцинированных против КЧС свиней, привитых не менее чем за 2 месяца до использования в опыте.

5.5. Выполнение процедуры получения вирусосодержащей крови

5.5.1. Подготовка вирусосодержащего материала к заражению животных

Для заражения животных используют вирус АЧС, из которого на физиологическом растворе готовят разведение с инфекционной активностью 1000 – 10000 ГАЕ₅₀/см³. Разведения из каждой ампулы вируса, которые получают из ГКМ ФГБНУ ФИЦВиМ, (не менее 2-х) готовят отдельно, после чего их объединяют.

Выделенный при проведении диагностических и мониторинговых исследований в пробах органов вирус АЧС используют для заражения свиней в виде 10 % органной суспензии (СОП 00561-01).

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вирусосодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 6 из 10

До заражения свиней, приготовленный материал можно хранить в бытовом холодильнике при температуре (0 – 4) °С не более 2 часов.

5.5.2. Заражение свиней и получение вирусосодержащей крови

Приготовленным разведением вирусосодержащего материала внутримышечно в объеме 1,5 см³ заражают не менее 3 подсвинков. Результаты заражения свиней совмещают с оценкой патогенных свойств вируса АЧС на целевых животных - СОП 00573-01. Вирус вводят свиньям с внутренней поверхности бедра или в область шеи, соблюдая правила асептики.

Ежедневный уход (кормление и уборка) за животными проводит лаборант-исследователь. Отходы жизнедеятельности инфицированных животных собираются в металлические баки, которые перед вывозом обсыпают порошком хлорамина Б (из расчета 100 грамм дезинфектанта на 1 емкость с отходами) и автоклавируют в проходном автоклаве при температуре (132 ± 2) °С в течение 2,5 часов, а затем сжигают в кремпечи корпуса 30. Уборочный инвентарь после каждого применения помещается в емкость из нержавеющей стали с дезинфектантом (5 % раствор хлорамина Б) и хранится до следующего использования.

За инфицированными животными ведут наблюдение с ежедневным измерением температуры тела. Фиксация и термометрия проводится микробиологом и научным сотрудником, после использования термометры помещают в емкость с дезинфицирующим средством. Данные термометрии вносят в рабочий журнал.

Как правило, на 3 – 4 сутки у инфицированных свиней регистрируют клинические признаки болезни, характеризующиеся угнетением, гипертермией и отказом от корма. Все признаки фиксируются в рабочем журнале.

Через 6 – 8 суток после заражения от свиней с ярко выраженными клиническими признаками АЧС или находящихся в агональном состоянии (гипертермия в течение 3 и более суток выше 41,0 °С, угнетение, парез конечностей, понос с примесью крови, цианоз кожных покровов и др.) отбирают пробы крови для криоконсервирования. У свиней, находящихся в агональном состоянии после гипертермии отмечается снижение температуры тела ниже 40,0 °С.

Вирусосодержащую кровь от свиней отбирают 3-мя способами:

- 1) Из краниальной поллой вены с помощью 20,0 см³ шприца;
- 2) Из хвостовой вены, после удаления кончика хвоста;
- 3) Из сердца путём прокола грудной клетки иглой и отбора крови 20,0 см³ шприцем типа «Рекорд». Обычно этот метод применяется при отборе вирусосодержащей крови от малоподвижных свиней, находящихся в агональном состоянии.

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вируссодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 7 из 10

Как правило, для криоконсервации от одного животного в сосуд отбирают 50 – 60 см³ вируссодержащей крови.

При получении для криоконсервации вируссодержащей крови в качестве антикоагулянтов применяют коммерческий раствор гепарина или этилендиаминтетрауксусную кислоту а также дефибринированную с помощью стеклянных бус вируссодержащую кровь. Кровь от каждого животного получают отдельно.

Получение вируссодержащей крови с гепарином. С этой целью в стеклянный сосуд в стерильном боксе вносят расчётное количество гепарина (50,0 ЕД раствора гепарина на 1,0 см³ вируссодержащей крови) и 3,0 см³ физиологического раствора. Для предотвращения образования сгустков крови этим раствором орошают внутренние стенки сосудов, куда затем вносят полученную от больных свиней вируссодержащую кровь.

Получение вируссодержащей крови с ЭДТА. Отобранную от инфицированных свиней вируссодержащую кровь вносят в стеклянный флакон с приготовленным на дистиллированной воде 5 %-ным раствором ЭДТА в соотношении 10:1. После этого вируссодержащую кровь от каждого животного объединяют в лабораторном боксе и используют в дальнейших исследованиях.

Получение дефибринированной вируссодержащей крови. С этой целью вируссодержащую кровь отбирают в стерильный сосуд со стеклянными бусами. Материал интенсивно в течение 15 – 20 минут встряхивают до образования хлопьев фибрина белого цвета. В боксовом помещении полученный вируссодержавший материал фильтруют через 4-х слойную стерильную марлевую салфетку.

В полученную с антикоагулянтами и методом дефибринирования вируссодержащую кровь в стерильном боксе вносят антибиотики: бензилпенициллин натриевую соль, стрептомицин сульфат по 250 ЕД (мкг) на 1,0 см³ материала, а также гентамицин и один из препаратов группы фторхинолонов 20 мкг на 1,0 см³. Вируссодержавший материал оставляют на 18 – 24 часа при комнатной температуре (18 – 22) °С. После этого полученную от каждого животного вируссодержащую кровь объединяют и разливают в криопробирки по 1,0 см³ и исследуют на отсутствие бактериальной, грибной и микоплазменной контаминации по СОП 00566-01, а также определения биологических характеристик вируса (инфекционной активности, патогенных свойств и серотиповой принадлежности), согласно СОП МШ-00173, СОП 00573-01 и СОП 00586-01 соответственно.

Ответственный исполнитель делает запись в рабочем журнале форма №514а/у о проделанной работе и учёте полученного вируссодержавшего материала.

До окончания этих исследований испытуемые материалы хранят в бытовом холодильнике при (0 – 4) °С. При отсутствии контаминации материала

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вирусодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 8 из 10

бактериальной, грибной и микоплазменной микрофлорой, определения типовой принадлежности и титра вируса, который должен составлять для вирусulentных штаммов не менее $6,5 \lg \text{ГАЕ}_{50}/\text{см}^3$, вирус АЧС паспортизируют, криопробирки этикетируют и закладывают на хранение в ГКМ ФГБНУ ФИЦВиМ, как правило, по 30 криопробирок при минус (40 – 50) °С. Срок хранения штамма при указанной температуре составляет не менее 15 лет.

По завершении опыта павших и вынужденно убитых (тотальным обезквашиванием полым ножом) животных помещают в металлические баки, обсыпают порошком хлорамина Б (из расчета 100 грамм дезинфектанта на 1 емкость) и автоклавируют в проходном автоклаве при температуре (132 ± 2) °С в течение 2,5 часов, а затем сжигают в кремпечи корпуса 30.

После вывоза животных и уборки крупного мусора виварный бокс обрабатывают 5,0 % раствором хлорамина с помощью гидропульта мелкокапельным распылением при норме расхода дезинфектанта $0,25 \text{ дм}^3$ на 1 м^2 площади, кормушки заливают 5,0 % раствором хлорамина. Через 24 часа в виварном боксе проводят влажную механическую уборку с применением гигиенических щеток и стирального порошка.

На следующие сутки виварный бокс двукратно с интервалом в 24 часа дезинфицируют 5,0 % раствором хлорамина с помощью гидропульта мелкокапельным распылением при норме расхода дезинфектанта $0,25 \text{ дм}^3$ на 1 м^2 площади.

Контроль качества проведенной заключительной дезинфекции проводят по СОП-00587.

5.6. Обеззараживание посуды, одежды

При работе с вирусом АЧС использованный лабораторный пластик (планшеты, наконечники) после их обеззараживания в 5%-ном растворе хлорамина Б в течение не менее 24 ч, костюмы для работы с опытными животными, перчатки, маски медицинские помещают в пакет для деструкции, который перекрывают зажимом. Стеклопосуду помещают в биксы для стерилизации. Заполненные пакеты для деструкции и биксы для стерилизации автоклавируют в течение 2 часов при (132 ± 2) °С ($2 \text{ кгс}/\text{см}^3$). Для контроля работы автоклава производят закладку термохимических тестов МедИС-132/20 соответствии с «Методическими указаниями по контролю работы паровых и воздушных стерилизаторов» № 15/6-5 от 28.02.1991 г.

6. Термины и определения

Не требуется.

7. Сокращения

7.1. АДВ - активное действующее вещество

7.2. ГКМ - государственная коллекция микроорганизмов

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00565-02
Название:	Получение нативной вируссодержащей крови для криоконсервирования и условия её хранения	Страница 9 из 10

- 7.3. ГОСТ - государственный стандарт
7.4. ККМС – культура костного мозга свиней
7.5. ЛС – лейкоциты свиней
7.6. НИР – научно-исследовательская работа
7.7. ОПШЖ - отдел подготовки подопытных животных
7.8. ГАЕ – гемадсорбирующие единицы
7.9. ФГБНУ ФИЦВиМ – Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»
7.10. ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

8. Ссылки

- 8.1. ГОСТ 12.1.008 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Биологическая безопасность. Общие требования».
8.2. СП 1.3.2322 – 08 «Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности), возбудителями паразитарных болезней».
8.3. СОП АД – 00003 «Подготовка производственных помещений к работе. Уборка помещений класса чистоты С и Д».
8.4. Инструкция по технике безопасности для сотрудников подразделений ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.
8.5. СОП ВС – 00069 «Инструкция по ветеринарно-санитарному режиму и технике безопасности при работе в боксах».
8.6. СОП АД – 00167 «Подготовка посуды к работе».
8.7. СОП ОО – 00470 «Инструкция по приготовлению дезинфицирующих растворов Хлорамина Б».
8.8. СОП 00566 – 01 «Определение микробиологической чистоты штаммов бактериальной, грибной, микоплазменной и вирусной этиологии»
8.9. СОП МШ – 00173 – 01 «Титрование вируса АЧС в культуре клеток и на свиньях».
8.10. СОП 00586 – 01 «Определение культуральных и серологических свойств вируса АЧС».
8.11. СОП 00573 – 01 «Определением патогенных свойств штаммов вирусов на лабораторных и целевых животных».
8.12. СОП 00561 – 01 «Получение органного вируссодержащего материала для криоконсервации».
8.13. СОП 00587 – 01 «Микробиологический контроль качества текущих, плановых и заключительных дезинфекций лабораторных и виварных помещений».

9. Приложения

Приложение №1 – Лист ознакомления с требованиями СОП.

