

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 1 из 9

Версия № 01	Дата введения: 30.11.2017
Причина пересмотра:	

Утверждение Процедуры	Должность	Ф.И.О.	Подпись	Дата
Разработал	Начальник отдела ГКМ	Балышев В.М.		«14» 11 2017г.
Разработал	Младший научный сотрудник	Иматдинов А.Р.		«14» 11 2017г.
Разработал	Младший научный сотрудник	Власов М.Е.		«17» 11 2017г.
Согласовал	Главный научный сотрудник	Юрков С.Г.		«17» 11 2017г.
Согласовал	Начальник ОСМК	Бобкова Т.Е.		«28» 11 2017г.
Согласовал	Заместитель директора по диагностическим исследованиям	Егорова И.Ю.		«24» 11 2017г.
Согласовал	Заместитель директора по НИР	Малоголовкин А.С.		«27» 11 2017г.
Утвердил	Директор ФГБНУ ФИЦВиМ	Колбасов Д.В.		«27» 11 2017г.

1. Цель

Установить требования к определению культуральных и серологических свойств новых изолятов вируса африканской чумы свиней (АЧС), выделенных от больных, павших свиней и из объектов ветеринарно - санитарного надзора.

2. Область применения

Данная СОП распространяется на сотрудников лабораторий (отделов), участвующих в изучении биологических свойств вируса АЧС с целью его паспортизации.

3. Распределение ответственности

Ответственными за организацию и координацию работ, регламентированных настоящей СОП, является заведующий отделом ГКМ.

Определение культуральных и серологических свойств новых изолятов вируса АЧС осуществляют научные сотрудники в паре с лаборантом-исследователем, имеющие высшее ветеринарное, биологическое или медицинское образование, прошедшие обучение на специализированных курсах

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 2 из 9

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.

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 с соблюдением принципа парности.

5.1.2. Подготовку боксового помещения, в котором проводятся работы с вирусом АЧС, проводят до начала работ, обеззараживание - по их окончании в соответствии с требованиями Инструкции по соблюдению требований ветеринарно-санитарного режима и противоэпидемической безопасности в отделе Государственной коллекции микроорганизмов.

5.1.3. Перед проведением работ готовят рабочий (5 %) и аварийный (10 %) растворы хлорамина Б по СОП АД-00011. Срок годности растворов 15 суток. Контроль концентрации АДВ в рабочих и аварийных растворах проводят при помощи химических индикаторов серии ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН.

5.2. Оборудование и инвентарь:

- автоклав электрический ВК-75 или аналог 1 шт.;
- бикс для стерилизации – 1 шт.;
- ведро пластмассовое на 8,0 дм³ - 1 шт.;
- весы аналитические – 1 шт.;

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 3 из 9

- ветошь для мытья пола – 2 м;
- горелка газовая, ГОСТ 5034-61 – 1 шт.;
- дозатор пипеточный одноканальный автоматический на 100 - 1000 мкл – 1 шт.;
- инвертированный световой микроскоп – 1 шт.;
- корнцанги, пинцеты, ГОСТ 21241 – 1 шт.;
- плита газовая – 1 шт.;
- CO₂-инкубатор – 1 шт.;
- стерилизатор огневой на 5 л – 1 шт.;
- холодильник бытовой с температурным режимом (4 ± 2) °С;
- цилиндры измерительные ГОСТ 25336-82Е емкостью 250 и 1000 см³ – 2 шт.;
- швабра для мытья пола пластмассовая – 1 шт.;
- шкаф ламинарный – 1 шт.

5.3. Сырье и материалы:

- антибиотики (пенициллин, стрептомицин, гентамицин);
- бумажные полотенца – 0,1 рулона;
- вата гигроскопическая, ГОСТ 5556-81 – 100 г;
- вирусный материал 9 амп.;
- зажим для пакета для деструкции – 4 шт.;
- индикатор МедИс-132/20 – 5 шт.;
- культуры клеток КМС или ЛС, полученные из Коллекции культур клеток лаборатории Лекарственные средства для животных – 1170 мл;
- маски медицинские одноразовые – 8 шт.;
- мыло туалетное, ГОСТ 28546-90 – 1 шт.;
- наконечники универсальные с фильтром для дозаторов объемом 1000 мкл – 2 штатива;
- одноразовые медицинские головные уборы, ГОСТ 23134 – 8 шт.;
- пакеты для деструкции – 4 шт.;
- пергамент – 50 г;
- перчатки нитриловые, медицинские № 7-10 – 24 шт.;
- препараты группы фторхинолонов (пемфлосаксин, ципрофлоксацин и др.);
- резиновые пробки № 14,5 ГОСТ 7852-76 – 60 шт.;
- резиновые пробки № 24 ГОСТ 7852-76 – 4 шт.;
- ручка шариковая, синяя – 1 шт.;
- сероспецифические сыворотки на вирус АЧС I-IX серотипов – 8 амп.;
- спирт этиловый, ГОСТ 5962-67 – 100 мл;
- спички ГОСТ 1820-2001 -1 кор.;
- физиологический раствор рН 7,0 – 7,4 – 500 мл;
- флаконы культуральные пластиковые на 25,0 см² – 106 шт.;

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 4 из 9

- флаконы пенициллиновые стеклянные объемом 10,0 – 60 шт.;
- флаконы стеклянные объемом 100,0 и 200,0 см³ ГОСТ 10782-85, ТУ 10-09-202-86, ТУ 64-210-87 – 4 шт.;
- халат хирургический одноразовый – 8 шт.;
- халаты медицинские, ГОСТ 24760 – 2 шт.;
- химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН – 4 шт.;
- хлорамин Б – 0,45 кг.

5.4. Определение культуральных и серологических свойств вируса АЧС

5.4.1. Подготовительные операции

5.4.1.1. Ответственный исполнитель перед началом работы в вирусологических боксовых помещениях обязан проинструктировать исполнителей о соблюдении техники безопасности при работе с газовой горелкой и этиловым спиртом при фламбировании обрабатываемых поверхностей.

5.4.1.2. Все работы, связанные с изучением культуральных и серологических свойств вируса АЧС, проводят в боксовом помещении, подготовленном по СОП АД-00003-02 «Подготовка производственных помещений к работе».

5.4.1.3. 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.

5.4.1.3. Персонал, участвующий в настоящей СОП должен работать в спецодежде (халат медицинский, халат медицинский одноразовый, чепчик, тапочки, маски медицинские, перчатки анатомические) соответствующей классу чистоты боксового помещения.

5.4.1.4. Растворы и среды допускают к использованию в работе только после всех необходимых видов технологического контроля (проверка на токсичность, ростовые свойства, стерильность), который проводят в лаборатории Лекарственных средств для животных. Питательную среду перед использованием просматривают на свету для оценки герметичности укупорки флаконов, прозрачности, отсутствия посторонних включений. Горловины культуральных сосудов с растворами, средами, культурой клеток и др. препаратами фламбируют спиртом.

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 5 из 9

5.4.2. Подготовка вирусосодержащего материала

В исследованиях используют полученные при проведении диагностических и мониторинговых исследований вирусосодержащую кровь, органно-тканевую суспензию и другой материал содержащий вирус АЧС, который получают из лаборатории Диагностики и мониторинга или другого подразделения ФГБНУ ФИЦВиМ. Перед исследованиями в испытуемый материал в стерильном боксе вносят антибиотики: бензилпенициллин натриевую соль и стрептомицин сульфат по 250 ЕД (мкг) на 1,0 см³ материала, или гентамицин и один из препаратов группы фторхинолонов по 20 мкг на 1,0 см³. Вирусосодержащий материал оставляют на 18 – 24 часа при комнатной температуре (18 – 22) °С, разливают в стерильные пенициллиновые флаконы по 0,5 – 1,0 см³ и используют в работе. До проведения исследований вирусосодержащие материалы можно хранить в бытовом холодильнике при (2 – 4) °С в течение 24 часов, при более длительном хранении - в низкотемпературном рефрижераторе при температуре минус (40 – 50) °С.

5.4.3. Определение культуральных свойств вируса АЧС

Культуральные свойства вируса АЧС оценивают по результатам заражения испытуемым вирусосодержащим материалом первичных культур клеток косного мозга свиней (КМС) или лейкоцитов свиней (ЛС). В этих культурах клеток вирус АЧС размножается без предварительной адаптации с проявлением феномена гемадсорбции - адсорбции на инфицированных клетках эритроцитов свиней напоминающих вид «ягоды малины».

В исследованиях используют полученную из лаборатории Лекарственных средств для животных 2 – 3 суточную культуру клеток КМС или ЛС, выращенную на пластиковых культуральных флаконах объёмом 25,0 см³.

Культуру клеток заражают 10⁻¹ – 10⁻³ разведениями испытуемого вирусосодержащего материала в объеме по 1,0 см³ на культуральный флакон. Каждым разведением вирусосодержащего материала заражают по 2 культуральных флакона, 2 флакона оставляют на контроль.

Просмотр культур клеток на наличие гемадсорбции проводят через каждые 24 часа при малом увеличении светового микроскопа (10 x 10) в течение 8 – 9 суток.

Инфицированные культуры клеток и контрольные инкубируют без смены питательной среды в СО₂-инкубаторе при (37,0 ± 0,5) °С.

При наличии в разведениях исследуемого материала вируса АЧС на поверхности клеток регистрируют адсорбирующие в несколько слоёв эритроциты свиней (феномен гемадсорбции), которые остаются прикрепленными к инфицированным клеткам при легком встряхивании. Через 72 – 96 часов наблюдается цитоллиз инфицированных клеток, тогда как контрольные культуры клеток остаются жизнеспособными на протяжении всего эксперимента.

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 6 из 9

Обнаружения вируса в различных разведениях вирусосодержащего материала свидетельствуют, что изучаемый изолят вируса АЧС обладает характерными для данного патогена культуральными свойствами - репродуцируется в культурах клеток КМС (ЛС) с проявлением гемадсорбирующих свойств.

5.4.4. Определение серологических свойств вируса АЧС

Серологические свойства вируса АЧС определяют типизацией возбудителя в реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд), которую ставят в соответствии с «Методическими положениями по типизации вируса африканской чумы свиней в реакции задержки гемадсорбции».

Постановку РЗГАд проводят с использованием 2 – 3 суточной культуры клеток КМС или ЛС, выращенных на пластиковых культуральных флаконах объемом 25,0 см³.

Основными компонентами РЗГАд являются референс – штаммы вируса АЧС: Л-57, К-49, М-78, Ф-32, ТСП-80, ТС-7, Уганда и Ставрополь 01/08 I-VIII серотипов соответственно и референс – сыворотки к ним. Референс-штаммы и референс-сыворотки получают из отдела ГКМ в соответствии с СОП 00526.

Перед постановкой реакции контрольные референс – штаммы и испытуемый вирус освежают (проводят 2 пассажа) в культуре клеток КМС или ЛС на культуральных флаконах объемом 25,0 см³. Работу с вирусом каждого из 8 серотипов в одном ламинарном шкафу проводят после фламбирования рабочей поверхности и обработки УФ в течение 30 минут.

РЗГАд ставят в объеме 10 см³, из которых 9,0 см³ составляет культуральная среда с монослоем клеток, 0,5 см³ - освеженный культуральный вирус и 0,5 см³ - специфическая референс – сыворотка в рекомендуемых разведениях (в соответствии с информацией в Паспорте на сыворотку).

После внесения вируса в культуру клеток в неё сразу же добавляют специфическую сыворотку. Культуральные флаконы помещают в СО₂-инкубатор при температуре (37,0 ± 0,5) °С.

РЗГАд ставят со следующими контролями: контроль культуры клеток (культура клеток с нормальной сывороткой свиньи – для оценки качества культуры клеток) – 2 фл., контроль типоспецифических референс – сывороток (на отсутствие неспецифической гемадсорбции) – 16 фл., контроль вируса (на наличие специфической гемадсорбции) – 16 фл.

Учет результатов РЗГАд проводят через 24 – 96 часов, при хорошо выраженной гемадсорбции в контролях вируса (не менее 3 – 5 клеток со специфической гемадсорбцией в поле зрения светового микроскопа) и её отсутствию в контролях специфических референс – сывороток. При этом типоспе-

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 7 из 9

цифические референс – сыворотки должны вызывать задержку гемадсорбции гомологичного вируса.

Задержка гемадсорбции типизируемого изолята одной из стандартных референс – сывороток указывает на её принадлежность к тому серотипу вируса, на который получена эта сыворотка.

5.5. Обеззараживание посуды, одежды

При работе с вирусом АЧС использованный лабораторный пластик (культуральные флаконы, наконечники) после их обеззараживания в 5 %-ном растворе хлорамина Б в течение не менее 24 часов, одноразовые хирургические халаты, перчатки, маски медицинские помещают в пакет для деструкции, который перекрывают зажимом. Стеклянную посуду помещают в биксы для стерилизации. Заполненные пакеты для деструкции и биксы для стерилизации автоклавируют в течение 2 часов при $(132 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (2 кгс/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.

5.6. Завершение работ

5.6.1. По окончании работ в боксовом помещении проводят уборку с последующей дезинфекцией согласно СОП ВС-00076. Учет ресурса работы бактерицидных ламп и проведения текущих и генеральных уборок регистрируют в соответствующих журналах.

5.6.2. Ответственный исполнитель делает запись в рабочем журнале форма № 514а/у о проделанной работе и учёте полученных результатах.

6. Термины и определения

Не требуется.

7. Сокращения

- 7.1. АДВ – активное действующее вещество;
- 7.2. ГКМ – государственная коллекция микроорганизмов
- 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. ООББ – отдел обеспечения биологической безопасности НИР
- 7.8. ОПШЖ – отдел подготовки подопытных животных
- 7.9. РЗГАд – реакция задержки гемадсорбции
- 7.10. УФ – ультрафиолет

	ФГБНУ ФИЦВиМ	
	СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА	СОП 00586-01
Название:	Определение культуральных и серологических свойств вируса африканской чумы свиней	Страница 8 из 9

7.11. ФГБНУ ФИЦВиМ – Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»

8. Ссылки

- 8.1. СП 1.3.2322 – 08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности)».
- 8.2. ГОСТ 12.1.008 «Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования».
- 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 00526 «Порядок получения патогенных биологических агентов из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии».
- 8.9. СОП 00574 – 01 «Определение инфекционной активности вирусных штаммов».
- 8.10 «Методические положения по типизации вируса африканской чумы свиней в реакции задержки гемадсорбции». ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Покров, 2010.

9. Приложения

Приложение №1 – Лист ознакомления с требованиями СОП.

