

Изменение № 1 ГОСТ 25382—82 Крупный рогатый скот. Методы лабораторной диагностики лейкозов

Утверждено и введено в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 23.06.89 № 1957

Дата введения 01.01.90

На обложке и первой странице стандарта после обозначения (СТ СЭВ 2702—80) дополнить обозначением: СТ СЭВ 6284—88.

Раздел 1 дополнить пунктом — 1.6: «1.6. Для иммуноферментного анализа использовать свежие пробы крови, но не ранее, чем через сутки после взятия. Недостаточно просветленные сыворотки крови центрифугируют. При длительном хранении проб сыворотку крови отделяют от кровяного сгустка. При хранении проб при плюс 4 °С сыворотки годны к исследованию в течение 10 сут. При хранении сыворотки при температуре минус 20 °С срок пригодности сыворотки для исследований — 1 год. Разложившиеся и сильно гемолизированные сыворотки для исследования не пригодны».

Раздел 2 дополнить пунктами — 2.5—2.5.3: «2.5. Иммуноферментный метод

Сущность метода заключается в адсорбции антигеном противовирусных антител на поверхности пластины при инкубировании испытуемой сыворотки с антивидовыми антителами, меченными ферментом, с последующей модификацией субстрата.

#### 2.5.1. Аппаратура, материалы, реактивы

Фотометр одно- или многоканальный с минимальным пределом показаний 1,5 экстинционных единиц и с автоматической регистрацией результатов.

Автоматическое или полуавтоматическое оборудование для промывания пластин.

Термостат, обеспечивающий температуру  $(37 \pm 0,5)$  °С.

Микропипетки одноканальные автоматические.

Микропипетки восьми- или двенадцатиканальные автоматические.

Микротитровальные пластмассовые пластины с 96 лунками.

Стаканы химические вместимостью 500 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770—74.

Колбы мерные вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770—74.

Колбы Эрленмейера вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336—82.

Пробирки по ГОСТ 25336—82.

(Продолжение см. с. 224)

*(Продолжение изменения к ГОСТ 25382—82)*

Пипетки градуированные вместимостью 1 и 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292—71.

Буферный раствор карбонатный с pH 8,8—9,6.

Буферный раствор физиологический фосфатный с pH 7,2—7,4, содержащий твин 20 или 80 (промывающий раствор).

Растворитель — промывающий раствор, содержащий инертный белок.

Антigen ВЛКРС для иммуноферментного анализа (ИФА), изготовленный из культуральной жидкости инфицированной ВЛКРС культуры клеток селезенки ягнят-эмбрионов (FLS) или почки ягнят-эмбрионов (FLK), содержащий компоненты вируса GP 51 и р 24, разведенный в карбонатном буферном растворе.

Сыворотка контрольная положительная, разведенная в растворителе.

Сыворотка контрольная отрицательная, представляющая собой смесь не менее чем из 10 отрицательных сывороток крупного рогатого скота, разведенная в растворителе.

Конъюгат — антитела против иммуноглобулинов крупного рогатого скота, меченные пероксидазой или другим ферментом, разведенные в растворителе.

Испытуемая сыворотка из крови крупного рогатого скота.

Субстрат ферментативной реакции.

#### *2.5.2. Проведение исследования*

В лунки микротитровальной пластины (панели) вносят по 0,05 или 0,1 или 0,2 см<sup>3</sup> раствора антигена. Пластины закрывают и инкубируют в течение 18 ч во влажной камере при температуре плюс 4 °C.

После этого пластины четырьмя раза промывают физиологическим фосфатным буферным раствором так, чтобы лунки заполнялись полностью, выдерживают в течение 3 мин и затем раствор из лунок тщательно удаляют.

Готовят исходные разведения испытуемых сывороток.

Испытуемые сыворотки в исходном разведении вносят параллельно в две соседние лунки микротитровальной пластины в количестве 0,05 или 0,1 или 0,2 см<sup>3</sup>. Таким же способом в каждую пластину вносят разведенные контрольные положительную и отрицательную сыворотки. На каждой пластине оставляют несколько лунок заполненных только растворителем (без сыворотки). Количество лунок с растворителем на пластине определяется конструкцией фотометра и используется для установки нулевого положения шкалы прибора.

Пластины закрывают и инкубируют при температуре от 20 до 37 °C во влажной камере в течение 60—120 мин.

*(Продолжение см. с. 225)*

*(Продолжение изменения к ГОСТ 25382—82)*

Промывают пластиину четыре раза промывающим раствором.

В лунки вносят по 0,05 или 0,1 или 0,2 см<sup>3</sup> раствора конъюгата, пластины закрывают и инкубируют при температуре от 20 до 37 °С во влажной камере в течение 60—120 мин.

Промывают пластиину четыре раза промывающим раствором.

В каждую лунку вносят по 0,05 или 0,1, или 0,2 см<sup>3</sup> раствора субстрата и инкубируют при температуре от 20 до 37 °С в течение 50—60 мин. При необходимости в лунки добавляют карбонатный буферный раствор, останавливающий

*(Продолжение см. с. 226)*

реакцию, и измеряют оптическую плотность в каждой лунке на фотометре при длине волны, характерной для выбранного субстрата.

*2.5.3. Обработка результатов*

Результат считают положительным, если оптическая плотность исследуемой пробы в обеих лунках в два или более раза превышает среднюю арифметическую величину оптической плотности для отрицательной пробы в соответствующем разведении».

*(ИУС № 10 1989 г.)*