

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРНОГО И
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО НАДЗОРА**

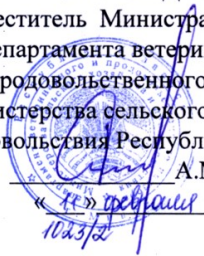
**РУП «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМ. С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО»**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра - директор
Департамента ветеринарного и
продовольственного надзора
Министерства сельского хозяйства и
продовольствия Республики Беларусь

А.М.Субботин

« 11 » февраля 2016 г.



**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, антигенных,
генетических свойств и инфекционной активности
производственных и эпизоотических штаммов
коронавируса крупного рогатого скота**

МИНСК 2016

Настоящие методические рекомендации по изучению культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных и эпизоотических штаммов коронавируса крупного рогатого скота подготовили:

Красочко П.А. – директор РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор;

Борисовец Д.С. – заведующий лабораторией вирусных инфекций свиней РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

Красочко И.А. – ведущий научный сотрудник отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, профессор;

Красочко П.П. – старший научный сотрудник научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», кандидат ветеринарных наук, доцент;

Тяпша Ю.И. – старший научный сотрудник отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

Дубаневич О.В. – младший научный сотрудник отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», магистр биологических наук.

Рецензенты:

Ястребов А.С. – главный научный сотрудник отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, доцент;

Медведев А.П. – профессор кафедры микробиологии и вирусологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», доктор ветеринарных наук, профессор.

Методические рекомендации рассчитаны на специалистов испытательных лабораторий, занимающихся оценкой и изучением штаммов при формировании и поддержании коллекций и музеев микроорганизмов, научных работников, аспирантов и магистрантов, а также студентов факультетов ветеринарной медицины, занимающихся проблемами вирусных инфекций.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены на заседании Ученого совета РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (протокол № 8 от 25 ноября 2015 г.).

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусная инфекция – остропротекающая болезнь новорожденных телят, характеризующаяся профузным поносом, иногда со слизью и кровью в каловых массах, дегидратацией организма, депрессией и истощением.

Возбудитель болезни – сложноорганизованный вирус из семейства *Coronaviridae*. Вирион состоит из спиралевидного нуклеокапсида, покрытого внешней липопротеидной оболочкой, на поверхности которой имеются широко расположенные булавовидные выступы длиной 10–23 нм, напоминающие корону.

Болезнь регистрируется у телят 7–18-дневного возраста, но чаще всего коронавирусный энтерит возникает у животных 8–14-дневного возраста. К заболеванию более предрасположены телочки (37,9%), чем бычки (23,8%). Порода скота и способ ведения животноводства не оказывают значительного влияния на частоту случаев болезни.

Источником возбудителя инфекции являются больные и переболевшие телята, клинически здоровые взрослые животные-вирусоносители, выделяющие вирус с экскрементами и мочой. Инфицированность коров в некоторых случаях составляет 50–80%. Факторами передачи возбудителя являются молоко, вода, кормушки, предметы ухода, подстилка и другие объекты, инфицированные коронавирусом. Заражение животных происходит чаще алиментарным путем, но возможен и воздушно-капельный. Заболевание регистрируется в любое время года, но чаще – в стойловый период, что связано со снижением резистентности организма телят и значительной инфицированностью помещений вирусом. В отдельных хозяйствах отмечается цикличность эпизоотий в пределах 3–4 лет. Заболеваемость телят коронавирусом энтеритом достигает 100%, а летальность колеблется от 10 до 47%. Довольно часто болезнь протекает в ассоциации с ротавирусной инфекцией и эшерихиозом.

Инкубационный период составляет 18–48 часов. Болезнь протекает остро и подостро. Вначале проявляются признаки угнетения, затем развивается понос, переходящий в профузный. Температура тела, как правило, в пределах нормы, иногда – ниже нормы. Фекалии жидкой консистенции, желтого или зеленовато-желтого цвета, обычно без дурного запаха, иногда – с примесью свернувшегося молока, слизи и крови. По мере развития болезни отмечают изъязвление слизистой оболочки ротовой полости, что сопровождается выделением пенистой слюны. Больные животные угнетены, живот вздут. Аппетит сохранен, однако телята очень быстро худеют, развивается эксикоз, наступает гибель от обезвоживания. Продолжительность болезни 1–2 недели. Характер течения болезни и ее исход во многом зависят от возраста телят: чем они моложе, тем острее протекает болезнь и быстрее наступает гибель. У взрослых животных болезнь протекает субклинически.

При вскрытии трупов павших телят выявляют кровоизлияние и язвы на слизистой оболочке ротовой полости, пищевода, сычуга. Двенадцатиперстная кишка – в состоянии анемии, заполнена газами, ее стенки истончены, прозрачны с геморрагическими язвами. Слизистая оболочка тощей кишки (а иногда и ободочной) – с точечными кровоизлияниями и небольшими язвами, содержит красно-бурую водянистую жидкость. Кроме того, отмечают гиперплазию мезентериальных лимфатических узлов.

Диагноз на коронавирусный энтерит основан на анализе клинико-эпизоотологических данных, патологоанатомических изменений в совокупности с лабораторными исследованиями.

Для проведения исследований в лабораторию направляют в термосе со льдом пробы фекалий от больных телят в пределах 24–48 часов от проявления диареи и пораженные участки кишечника с содержимым, полученные в течение 2–4 часов с момента гибели животного, а также парные пробы сыворотки крови с интервалом 2–3 недели.

Клинический вирусосодержащий материал исследует в реакции гемагглютинации (РГА), торможения гемагглютинации (РТГА), торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), иммунофлуоресценции (РИФ) и иммуноферментном анализе (ИФА), а также применяют иммунную электронную микроскопию. Указанные методы позволяют обнаружить в фекалиях и содержимом кишечника характерные вирионы или специфические антигены коронавирусов. Вирусологические исследования включают выделение вируса в клеточных культурах с последующей идентификацией в реакции нейтрализации (РН), иммунофлуоресценции (РИФ), торможения гемадсорбции (РТГАд), торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноферментном анализе (ИФА). Ретроспективная диагностика предусматривает выявление прироста титра специфических антител в парных пробах сыворотки крови с помощью реакции нейтрализации (РН), непрямой гемагглютинации (РНГА), торможения гемагглютинации (РТГА), иммуноферментного анализа (ИФА).

Коронавирусную инфекцию дифференцируют от вирусной диареи, парво- и ротавирусной инфекции, хламидиоза, колибактериоза.

Для лечения используют гипериммунные сыворотки и сыворотки реконвалесцентов, в которых имеются антитела к коронавирусу одновременно с антибактериальными и иммуностимулирующими препаратами, пробиотики. Применяют также симптоматические методы лечения.

Для специфической профилактики используют живые и инактивированные моно- и ассоциированные вакцины, гипериммунные сыворотки. Для ликвидации заболевания используют общие противоэпизоотические мероприятия – ограничение движения скота, дезинфекция, карантинирование больных животных, соблюдение принципа пусто-занято.

1 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ И КОНТРОЛЬНЫМ ШТАММАМ КОРОНАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ, ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК, ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН

1.1 Контрольные штаммы коронавируса крупного рогатого скота должны иметь характерные (в рамках семейства или рода) морфологические, биологические свойства, обладать генетически закрепленным уровнем вирулентности, инфекционной, антигенной и иммуногенной активности.

1.2 Штамм коронавируса может культивироваться *in vitro* или в организме естественно восприимчивого животного, сохраняя фиксированные показатели вирулентных свойств в течение не менее 10 пассажей. Культивирование вируса в культуре клеток должно обеспечиваться отечественными или импортными средами и сывороткой крови, а также другими недефицитными материалами.

1.3 Штаммы должны обладать определенной инфекционной активностью, антигенными свойствами и иммуногенностью.

1.4 Штаммы должны сохранять инфекционную активность при хранении в лиофилизированном состоянии при минусовых температурах (в соответствии с паспортными данными) без существенного снижения титра (не более $0,5 \lg$ ТЦД₅₀/мл в течение 12 месяцев).

1.5 Для изготовления живых вакцин против коронавирусной инфекции крупного рогатого скота используют штаммы вирусов, обладающие пониженной вирулентностью, умеренной реактогенностью, безвредностью и иммуногенностью для естественно восприимчивых животных всех возрастов, не способные к реверсии в вирулентное состояние.

1.6 Штамм не должен представлять опасность заражения животных других видов и человека.

1.7 Для вакцинного штамма определяют оптимальную иммунизирующую дозу и продолжительность создаваемого им иммунитета у животных разных возрастных групп.

1.8 Штамм должен быть устойчив к реверсии в сторону вирулентности у естественно восприимчивых животных на протяжении шести последовательных пассажей испытуемого штамма вируса на этих животных.

1.9 Штамм должен культивироваться в культуре клеток *in vitro* в условиях, обеспечивающих его чистоту в отношении контаминантов, генетическую стабильность в отношении иммуногенных, антигенных и других биологических свойств на протяжении не менее 10 прямых пассажей.

1.10 Необходимые требования к коронавирусу крупного рогатого скота:

Таблица 1 – Требования к коронавирусу крупного рогатого скота

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса в монослое клеток MDBK	часы	72–96
2	оптимальная доза заражения	ТЦД ₅₀ /мл	0,2–1,0
3	объемная доза заражения	мл/л вир. сусп.	1:30–1:100
4	оптимальное значение pH при репродукции	ед. pH	7,2–7,6
5	оптимальная температура размножения	°С	36,0–37,5
6	титр инфекционности после репродукции в монослое клеток MDBK	lg ТЦД ₅₀ /мл	5,5 и выше
7	стерильность	кол-во колоний в мл.	не допускается
8	типоспецифичность	типсовая принадлежность	типоспецифичен

2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования коронавируса крупного рогатого скота:

Культуры клеток, предназначенные для лабораторного культивирования коронавируса крупного рогатого скота с целью изучения морфологических свойств вируса, должны характеризоваться высокой пролиферативной активностью (индекс пролиферации от 3,0 до 4,0), а также чувствительностью к вышеуказанному вирусу. Популяции клеток должны обладать устойчивостью к криоконсервированию (жизнеспособность 95–99% при – 196°С в течение 10 лет); при 4°С хранятся до 10 суток (жизнеспособность 90–95%).

Клетки должны быть адаптированы к монослойному культивированию на матрасах или в роллерных флаконах, выдерживают колебания pH в пределах 6,6–7,4, в пассажах — до 6,8–7,3.

Клетки должны быть свободны от контаминантов, присутствие которых контролируется посевами на элективные среды, окраской оливомицитином и акридином оранжевым.

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов коронавируса крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

- аппарат для промывки планшетов MINI-WASHER-350 (при необходимости), («Organon Teknika», Нидерланды или других изготовителей);

- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020–0,20, 0,20–1,0 см³ по ТУ 64-16-55 или по другим действующим ТНПА;

- микроскоп инвертированный («Nikon», Япония или других изготовителей);
- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30 см³ и до 1,0 см³ («Plastibrand», Германия или других изготовителей);
- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс (37±1,0)°С («Термо», США или аналогичный других изготовителей);
- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°С до плюс 8°С по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;
- СО₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% СО₂ и температуру нагрева плюс (37±1,0)°С (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);
- стаканы стеклянные вместимостью 50 см³ ГОСТ 25336;
- пипетки 1, 5, 10 см³ по ГОСТ 29227;
- флакон вместимостью 50 см³ по действующим ТНПА;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;
- среда Игла МЕМ («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;
- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (фетальная сыворотка), ("HyClone" или других изготовителей);
- культура клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурис», ПЭК, ЛЭК;
- антибиотики (гентамицин с массовой долей 4%, пенициллин и стрептомицин по ТНПА изготовителя).

2.3 Выращивание клеток в монослое.

2.3.1 Реконсервирование клеток.

Для культивирования вируса используют культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурис», ПЭК, ЛЭК, которые хранятся в жидком азоте (-196°С) в ампулах объемом 10–75 мл или в морозильнике при температуре -85°С, в пластиковых флаконах объемом от 100 до 500 мл. Ампулы или флаконы с суспензией клеток извлекают из хранилища, помещают в водяную баню с температурой 40°С и выдерживают до полного оттаивания.

В боксе ампулы протирают тампоном, смоченным в спирте, запаянный конец ампулы надрезают пилкой, отламывают, суспензию клеток переносят во флаконы стерильным шприцем; разводят в 5–10 раз ростовой питательной средой, добавляя ее небольшими порциями для предотвращения осмотического шока клеток в 4 приема с интервалом в 1 минуту. Отбирают пробу для контроля стерильности и подсчета клеток.

2.3.2 Подсчет концентрации клеток.

Концентрацию клеток подсчитывают в камере Горяева под малым увеличением микроскопа. К 1 мл клеточной взвеси добавляют равный объем 0,2% раствора трипановой сини, тщательно перемешивают и заправляют камеру. Количество клеток в 1 мл суспензии определяют по формуле:

$$X = \frac{A \times B \times 4000}{3600} \times 1000, \text{ где}$$

X – количество клеток в 1 мл;

A – общее количество клеток в камере;

B – разведение суспензии.

Клетки используют для выращивания в монослое.

2.3.3 Выращивание клеток в монослое.

После реконсервации суспензию клеток доводят питательной средой до концентрации 200–300 тыс./мл жизнеспособных клеток после чего высевают на матрас вместимостью 100–250 мл.

Клетки выращивают 48–72 ч при pH-7,0–7,4 и температуре 37°C. Через 24 часа проводят смену питательной среды. Сформировавшийся монослой для проведения последующих пассажей снимают бесцентрифужным способом. Из матрасов удаляют ростовую среду, монослой клеток дважды ополаскивают смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1:9. Культуру укладывают пластом вверх, в таком положении она находится 10–15 минут. Все манипуляции проводят при комнатной температуре, растворы и питательная среда имеют эту же температуру.

Отслоившиеся от стекла клетки ресуспендируют в небольшом количестве питательной среды (50 мл) путем энергичного встряхивания, затем добавляют удвоенное количество питательной среды. Суспензию клеток с одного матраса высевают в два матраса емкостью 100–250 мл, т.е. пересев проводят с коэффициентом 1:2.

На следующем пассаже пересев осуществляют в 1,5 л матрас проводя все операции как описано выше. Таким образом, проводят ещё 2–3 пассажа каждый раз увеличивая количество матрасов в 2–3 раза, в течение которых клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства.

2.3.4 Криоконсервирование клеток.

Для успешного криоконсервирования клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК, выращенных в монослое, необходимо брать их в конечной стадии логарифмического роста. С монослоя клетки снимаются трипсин-версеном. Полученная суспензия должна иметь жизнеспособность не менее 95–100%. Для концентрирования и частичного освобождения суспензии от отработанной среды, ее центрифугируют при 1000 об/мин. К клеточному осадку добавляют свежей ростовой среды и доводят до нужной концентрации (20–35 млн. клеток в мл). В концентрат клеток добавляют 5–7% полиэтиленгликоля ММ 6000 и сразу расфасовывают в ампулы, которые запаивают на кислородной горелке или полистироловые флаконы. Ампулы и флаконы маркируют и помещают в контейнеры. Экспозиция с криопротектором до начала замораживания не должна превышать двух часов.

Подготовленные контейнеры с ампулами размещают в камеру замораживания программного устройства или лабораторной установки и после этого начинают двухэтапное понижение температуры: на первом этапе до -30°C ($1-2^{\circ}\text{C}$ в мин); на втором этапе – до 150°C ($8-10^{\circ}\text{C}$ в мин); далее объект переносят в жидкий азот на длительное хранение.

После переноса контейнеров с ампулами в жидкий азот необходимо, чтобы при испарении жидкой фазы ампулы не находились при более высокой температуре. В жидком азоте клетки могут храниться без изменения жизнеспособности более 10 лет.

2.3.5 Подготовка штаммов коронавируса крупного рогатого скота к культивированию.

Материалом для заражения монослойных культур служат изучаемые или музейные штаммы коронавируса крупного рогатого скота. С учётом титра вируса, указанного в паспортах, музейный вирус разводят питательной средой для монослойного выращивания клеток из расчёта $0,5-0,8$ ЛД₅₀ на клетку. Затем с помощью поддерживающей среды доводят заражающую дозу вируса, предназначенную для заражения матраса, до $5-10$ мл. Приготовленный вирусный материал инокулируют в матрасы с культурой клеток, которые предварительно дважды отмывают той же средой от остатков ростовой среды. Затем в течение 60 минут осуществляют адсорбцию вируса на клетках при температуре 37°C . После указанной экспозиции инокулят сливают, а монослой трижды отмывают поддерживающей питательной средой с рН $7,4-7,6$. Затем в матрасы вносят по $100-150$ мл поддерживающей среды с антибиотиками: пенициллином, стрептомицином и левомицетином по 200 Ед каждого.

Инкубацию зараженных клеточных культур проводят при температуре 37°C до специфического поражения монослоя (ЦПД) на $20-25\%$ ($48-72$ ч). После замораживания и оттаивания культуральную вирусосодержащую жидкость сливают в одну емкость, корректируют рН до $7,2-7,6$ и расфасовывают в пенициллиновые флаконы по 10 мл, маркируют (этикеттируют) и хранят при температуре -40°C .

При освежении лиофилизированного вирусного материала его разводят на питательной среде с рН $7,5-7,6$ и выращивают в матрасах с монослойной культурой клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК.

Второй и третий пассаж проводят аналогичным способом. После оттаивания вируса первого пассажа в водяной бане при температуре 40°C им заражают монослойные культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК по 10 мл на матрас или по 20 мл на роллер. Клеточные культуры предварительно отмывают от ростовой среды. Адсорбцию проводят в течение 60 минут, после чего монослой клеток отмывают $2-3$ раза и заливают питательной средой по $100-150$ мл с рН $7,5-7,6$. Инкубируют при температуре 37°C до появления ЦПД на $75-90\%$. После замораживания-оттаивания и корректировки рН вирусосодержащую жидкость второго пас-

сажа в необходимом количестве фасуют в пенициллиновые флаконы по 10 мл, а остальной вирусный материал – по 100–300 мл и хранят при температуре -40°C .

2.3.6 Характерные изменения клеток под воздействием коронавируса крупного рогатого скота.

ЦПД коронавируса проявляется не ранее, чем через 72 часа и характеризуется округлением клеток, зернистостью расположением их кучками в виде пауков.

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ КОРОНАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

3.1 Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов коронавируса крупного рогатого скота определяют методом титрования в одной из культур клеток — MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК.

3.2 Последовательные десятикратные разведения коронавируса крупного рогатого скота от 10^{-1} до 10^{-8} готовят в 24-луночной планшете. Для этого в 8 лунок вносят по $0,9\text{ см}^3$ питательной среды. Затем в первую лунку вносят $0,1\text{ см}^3$ нативного вируса, получая его разведение 10^{-1} . Жидкость в первой лунке тщательно пипетируют дозатором и переносят $0,1\text{ см}^3$ во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса 10^{-8} включительно.

Берут культуральный планшет с выращенным монослоем культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК и удаляют из него ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку, переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем по $0,1\text{ см}^3$ каждого разведения вируса 10^{-1} , затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по $0,1\text{ см}^3$ разведения вируса 10^{-2} и так далее до разведения 10^{-8} включительно.

В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и $0,1\text{ см}^3$ поддерживающей среды).

Культуру клеток в планшетах инкубируют в CO_2 -инкубаторе при 5% CO_2 и температуре $(37,0\pm 1,0)^{\circ}\text{C}$.

Учет реакции проводят путем микроскопирования монослоя клеток спустя 2 суток после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учет проводят на шестой день инкубации.

Титр коронавируса крупного рогатого скота вычисляют по общепринятому методу Рида и Менча [3] и выражают в количестве инфекционных доз, приходящихся на единицу объема.

Инфекционная активность производственных штаммов коронавируса крупного рогатого скота должна быть не ниже 5,5 lg ТЦД₅₀/мл.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

4.1 Специфичности штаммов коронавируса крупного рогатого скота определяют в реакции нейтрализации со стандартными гипериммунными сыворотками.

4.2 Для изучения специфичности штаммов коронавируса крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

- аппарат для промывки планшетов MINI-WASHER-350 («Organon Teknika», Нидерланды или других изготовителей);

- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020–0,20, 0,20–1,0 см³ по ТУ 64-16-55 или по другим действующим ТНПА;

- микроскоп инвертированный («Nikon», Япония или других изготовителей);

- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30 см³ и до 1,0 см³ («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- секундомер по ГОСТ 577;

- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс (37±1,0)°С («Thermo», США или аналогичный других изготовителей);

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°С до плюс 8°С по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;

- шейкер для планшет FS-4 (при необходимости), («Labotek», Дания или других изготовителей);

- СО₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% СО₂ и температуру нагрева плюс (37±1,0)°С (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- пипетки 1, 5, 10 см³ по ГОСТ 29227;

- цилиндр мерный вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770;

- флакон вместимостью 50 см³ по действующим ТНПА;

- среда Игла МЕМ («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;

- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (фетальная сыворотка производства фирм «Sigma», «HyClone» или других изготовителей);

- культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК из банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;

- сыворотка гипериммунная против коронавируса крупного рогатого скота (IDEXX или Hira);

4.3 Постановка реакции нейтрализации с гипериммунной и отрицательной сыворотками в планшетах.

4.3.1 Реакцию ставят методом разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-8} с постоянной дозой гипериммунной сыворотки в разведении 1:10 и отрицательной (фетальной) сыворотки крупного рогатого скота в разведении 1:10. Последовательные десятикратные разведения коронавируса крупного рогатого скота от 10^{-1} до 10^{-8} готовят в 24-луночной планшете. Для этого в 8 лунок вносят по $0,9 \text{ см}^3$ питательной среды. Затем в первую лунку вносят $0,1 \text{ см}^3$ нативного вируса, получая его разведение 10^{-1} . Жидкость в первой лунке тщательно пипетируют дозатором и переносят $0,1 \text{ см}^3$ во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса 10^{-8} включительно.

Затем в стерильный 24-луночный планшет в каждую лунку вносят по $0,5$ каждого разведения вируса и добавляют по $0,5$ мл гипериммунной против коронавируса сыворотки в разведении 1:10.

Аналогично производят смешивание отрицательной сыворотки с различными разведениями вируса.

Смесь сывороток с вирусом осторожно перемешивают, планшет закрывают крышкой и помещают в CO_2 -инкубатор, где выдерживают при 5% CO_2 и температуре плюс $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ в течение 1 часа.

4.3.2 Берут культуральные планшеты с выращенным монослоем культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Гаурус», ПЭК, ЛЭК и удаляют из них ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку переносят в первые 4 лунки с клеточным монослоем по $0,2 \text{ см}^3$ смеси сыворотки в разведении 1:10 и вируса в разведении 10^{-1} . Затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по $0,2 \text{ см}^3$ смеси сыворотки 1:4 и вируса разведения 10^{-2} и так далее до разведения 10^{-8} включительно.

Аналогично производят внесение на монослой отрицательной сыворотки с различными разведениями вируса.

4.3.4 В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и $0,1 \text{ см}^3$ поддерживающей среды);

- контроль вируса (по 4 лунки с культурой клеток, зараженных разведениями вируса 100 ТЦД_{50});

- контроль гипериммунной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с $0,05 \text{ см}^3$ гипериммунной сыворотки и $0,15 \text{ см}^3$ среды);

- контроль отрицательной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с $0,05 \text{ см}^3$ отрицательной сыворотки и $0,15 \text{ см}^3$ среды).

Культуру клеток в пробирках инкубируют в CO_2 -инкубаторе при 5% CO_2 и температуре $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$.

Учет реакции проводят путем микроскопирования монослоя клеток

спустя 24 часа после постановки реакции и далее ежедневно в течение 5-6 суток с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учет проводят на 5-6 день инкубации.

4.3.5 Видовую принадлежность вируса и его специфичность определяют по разности показателей между отрицательной и положительной сыворотками. Разница должна быть не менее, чем на $2,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

5.1 Антигенную активность штаммов коронавируса крупного рогатого скота проводят путем изучения иммунного ответа у лабораторных животных после введения испытуемых вирусов.

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов коронавируса крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

- аппарат для промывки планшетов MINI-WASHER-350 («Organon Teknika», Нидерланды или других изготовителей);

- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020–0,20, 0,20–1,0 см^3 по ТУ 64-16-55 или по другим действующим ТНПА;

- микроскоп инвертированный («Nikon», Япония или других изготовителей);

- законечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30 см^3 и до 1,0 см^3 («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- секундомер по ГОСТ 577;

- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс $(37 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ («Thermo», США или аналогичный других изготовителей);

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°C до плюс 8°C по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;

- шейкер для планшет FS-4 (при необходимости), («Labotek», Дания или других изготовителей);

- CO_2 -инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO_2 и температуру нагрева плюс $(37 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- стаканы стеклянные вместимостью 50 см^3 ГОСТ 25336;

- пипетки 1, 5, 10 см^3 по ГОСТ 29227;

- цилиндр мерный вместимостью 100 см^3 по ГОСТ 1770;

- флакон вместимостью 50 см^3 по действующим ТНПА;

- шприцы инъекционные однократного применения по ГОСТ 24861;

- иглы инъекционные однократного применения по ГОСТ 25046;

- бумага фильтровальная по ГОСТ 12026;

- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

- натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор стерильный физиологический с массовой долей 0,85% (рН 7,2–7,4);
- среда Игла MEM («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;
- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (фетальная сыворотка производства фирм «Sigma», «HyClone» или других изготовителей);
- культура клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК из банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»;
- штамм коронавируса крупного рогатого скота;
- клинически здоровые кролики живой массой по 2,5–4,0 кг – 4 головы.

5.3 Испытание проводят на четырех клинически здоровых кроликах живой массой 2,5–4,0 кг, в сыворотке крови которых отсутствуют вируснейтрализующие антитела к коронавирусу крупного рогатого скота, определяемые в реакции нейтрализации. Исследуемый вирус, с инфекционным титром не менее $5,5 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$ в объеме по $3,0 \text{ см}^3$ вводят двукратно с интервалом 21 день внутримышечно каждому из четырёх кроликов. Через 21 суток после вторичной иммунизации у всех животных берут кровь с целью получения проб сывороток согласно и последующего их исследования на наличие вируснейтрализующих антител к коронавирусу крупного рогатого скота.

5.4 Постановка реакции нейтрализации с коронавирусом крупного рогатого скота в планшетах.

Реакцию ставят методом разведения испытуемых сывороток, предварительно инактивированных при 56°C в течение 30 мин, с постоянной дозой вируса – $100 \text{ TЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. Для этого на трех стерильных планшетах готовят последовательные двукратные разведения сывороток от 1:2 до 1:64 на поддерживающей питательной среде в объеме $0,1 \text{ см}^3$, используя для каждого разведения по 4 лунки. Для этого во все используемые лунки планшетов разливают по $0,1 \text{ см}^3$ питательной среды. Затем в первые четыре лунки вносят по $0,1 \text{ см}^3$ исследуемой сыворотки крови, получая ее разведение 1:2. Используя многоканальную пипетку с четырьмя одноразовыми наконечниками, жидкость в первых лунках тщательно пипетируют и переносят по $0,1 \text{ см}^3$ в следующие четыре лунки. Операцию повторяют последовательно до получения разведения сыворотки от 1:2 до 1:64 включительно, удалив из последних четырех лунок по $0,1 \text{ см}^3$.

После этого в каждую лунку с приготовленными разведениями сыворотки добавляют по $0,1 \text{ см}^3$ предварительно титрованного вируса, содержащего $100 \text{ TЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$.

Смесь сыворотки с вирусом осторожно перемешивают, планшет закрывают крышкой и помещают в CO_2 -инкубатор, где выдерживают при

5% CO₂ и температуре плюс (37,0±1,0)°С в течение 1 часа.

Берут культуральный планшета с выращенным монослоем культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК и удаляют из них ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем по 0,2 см³ смеси сыворотки в разведении 1:2 и вируса, содержащего 100 ТЦД₅₀/0,1 см³. Затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по 0,2 см³ смеси сыворотки в разведении 1:4 и вируса, содержащего 100 ТЦД₅₀/0,1 см³, и так далее до разведения 1:64 включительно.

В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и 0,1 см³ поддерживающей среды);

- контроль вируса (по 4 лунки с культурой клеток, зараженных разведениями вируса от 0,1 до 100 ТЦД₅₀/0,1 см³, десятикратным шагом и 0,1 см³ среды);

- контроль сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с 0,05 см³ каждой из тестируемых сывороток и 0,15 см³ среды).

Культуру клеток в пробирках инкубируют в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и температуре (37,0±1,0)°С.

Учет реакции проводят путем микроскопирования монослоя клеток спустя 2 суток после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учет проводят на шестой день инкубации.

Титр антител к коронавирусу крупного рогатого скота вычисляют по общепринятой методике и выражают в логарифмах с основанием 2 (log₂).

Вирус считают активным при условии, что титр антител в сыворотках крови привитых кроликов в реакции нейтрализации на культуре клеток составляет 1:16 (4,0 log₂) и выше.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

6.1 Генетическая идентичность и принадлежность штаммов вируса коронавирусной инфекции крупного рогатого скота определяется с использованием полимеразной цепной реакции в биологических пробах с идентификацией продуктов амплификации в геле агарозы. Для этого используют тест-системы различных фирм-производителей, согласно инструкциям по их применению.

6.2 Для проведения генетической идентификации штаммов коронавируса крупного рогатого скота с помощью тест-системы БелНИИЭВ (ТУ ВУ 600049853.280–2015) используют следующие реактивы и оборудование:

оборудование:

- ламинар;
- микротермостат «BIOSAN-CH100»(Латвия);
- амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США);
- персональный компьютер (Windows XP, 2 GHz, 512 Mb RAM, 80 Gb HDD, CD-RW, USB 2.0, мышь);
- микроцентрифуга высокоскоростная (14 000 об/мин) Jouan (Франция);
- комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария), вместимостью 0,1-2 мкл, 0,5-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 1-10 мл и накопники к ним (с фильтрами и без фильтров);
- пробирки для микропроб типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл;
- вортекс «BIOSAN» (Латвия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler»;
- холодильник «Атлант МХМ 1841» (ЗАО «Атлант», РБ);
- система для электрофореза «Consort», (Бельгия);
- Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США);
- термостат SEL LAB (Германия);
- весы RADWAG AS 220/X (Польша);
- система подготовки чистой воды «Crystal В», ADRONA (Латвия);
- паровой автоклав;
- иономер (рН - метр);
- кюветы эмалированные 25x15 см²;
- ножницы остроконечные;
- пинцеты хирургические и анатомические;
- шприцы типа «Рекорд» ГОСТ 22967-97 – 1 мл и 5 мл;
- иглы инъекционные ГОСТ 25377-87;

реактивы:

- набор реактивов для выделения общей РНК из образцов тканей и клеток с использованием неорганического сорбента («РНК – ВТК» ТУ ВУ 100185129.076);
- буфер для обратной транскрипции«Fermentas» (Литва, кат. номер EP0441);
- рибонуклеазный ингибитор (RiboLock) («Fermentas», Литва, кат. номер EO0381);
- обратная транскриптаза (RevertAid M-MuLV) («Fermentas», Литва, кат. номер EP0441);
- буфер для ПЦР (Buffer “AM” 10X) (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер R1 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер F1 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер F2 (Паспорт на продукцию (Праймтех));

- смесь дезоксинуклеотидов«Fermentas», Литва, кат. номер R0192;
- taq-полимераза (Taq DNA polymerase) «Fermentas», Литва, кат. номер EP0402;
- магния хлорид (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- сахароза«Sigma», США, кат. номер B21361;
- агароза «Sigma», США, кат. номер A 4679;
- физиологический раствор;
- этидиум бромид«Sigma», США, кат. номер E 7637;
- маркер (GeneRuler 50 bp DNA Ladder) «Fermentas», Литва, кат. номер SM0371;
- раствор для электрофореза (Tris-EDTA Buffer 100x Concentrate«Sigma», США, кат. номер T9285;
- вода дистиллированная ГОСТ 6709;
- 3% хлорамин;
- 5% перекись водорода;
- бромкрезоловый красный «Sigma», США, кат. номер S0809.

6.3 Материал для исследования.

Метод рассчитан на выявление РНК в штаммах вируса коронавирусной инфекции КРС и в пробах биологического материала от крупного рогатого скота.

6.4 ПЦР- анализ.

6.4.1 Подготовка исследуемой пробы материала.

Штаммы вируса коронавирусной инфекции в предварительной пробоподготовке не нуждаются.

Для исследования биологического материала используют патматериал, фекалии, внутренние органы, истечения носовых путей, цельную кровь.

Фекалии суспензируют в фосфатном буфере, затем центрифугируют 1 мин при 10 тыс. об/мин. Для выделения РНК вируса используют 0,1 мл надосадочной жидкости. Допускается однократное замораживание проб до исследования при температуре минус 8°С до минус 20°С.

При использовании в работе органов и тканей павших или вынужденно убитых животных, кусочки органов измельчают ножницами и растирают в физиологическом растворе. Для исследования достаточно 0,2 мл суспензии биоматериала.

Цельную кровь, отбирают из яремной вены, хвостовой вены в стерильные пробирки с 3%-ным раствором ЭДТА из расчета 1:10 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. Материал доставляют в лабораторию, не позднее, чем через три дня с момента забора материала, сохраняя при температуре от плюс 2°С до 8°С. Для исследования достаточно 0,20 мл жидкости биоматериала.

6.4.2 Типирование штаммов вируса коронавирусной инфекции КРС

Используют праймеры синтезированные к области высококонсерва-

тивного гена S (спайковый гликопротеид), являющийся основным структурным белком, отвечающий за инфекционность. Локализация нуклеотидной последовательности, кодирующей спайковый гликопротеин в геноме вируса коронавируса, соответствует позиции с 25084 до 25337 нуклеотида (данные представлены по последовательности полного гена штамма «Mebus».

6.4.3 Порядок проведения исследований.

ПЦР-анализ проводят в три этапа в отдельных комнатах (зонах).

6.4.3.1 Этап 1 (зона 1).

Выделение РНК из исследуемого материала проводят набором реактивов для выделения общей РНК из образцов тканей и клеток с использованием неорганического сорбента («РНК – ВТК»).

На всех этапах исследования в первую очередь желательно проводить манипуляции с отрицательным контрольным образцом (ОКО), затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контрольным образцом (ПКО). Посуда для отбора биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромпиком, отмыта, стерильна. Перед открыванием пробирок с биологическими жидкостями капли на крышках удалять центрифугированием, избегать случайного касания внутренних поверхностей крышек руками или инструментами.

На всех стадиях обработки биоматериала осадочную жидкость удалять одноразовыми пластиковыми наконечниками с аэрозольным барьером и пипеткой полуавтоматической или водоструйным насосом в колбу ловушку с раствором дезинфицирующим (3% хлорамин или 5% перекись водорода).

Бромистый этидий разлагается на свету и при нагревании. Содержащие его растворы хранить в темном месте.

Растворы для выделения РНК за 30 мин до начала работы достать из холодильника и оставить при комнатной температуре плюс (18–25)°С.

Элюирующий раствор за 10 мин до использования поместить в твердотельный термостат с температурой плюс 45°С.

Для выделения РНК взять определенное количество (2+N) микропробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 мл (N – число исследуемых образцов) маркировать арабскими цифрами, включая ОКО и ПКО. В маркированные пробирки полуавтоматической пипеткой внести по 0,40 мл раствора денатурирующего и по 0,10 мл исследуемых образцов, ПКО и ОКО. Затем содержимое пробирок перемешать на вортексе, добавить в каждую пробирку по 0,10 мл суспензии сорбента неорганического (0,050 г сорбента в 1,3 мл раствора денатурирующего), и снова перемешать смесь. Инкубировать смесь при комнатной температуре (18–25)°С в течение двух мин, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин.

После из пробирок отобрать пипеткой полуавтоматической по 0,30 мл надосадочной жидкости, смешать с равным количеством спирта

этилового с объемной долей 96% (раствора 3), перемешать, и нанести смесь на колонку, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин. Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической с отдельным наконечником с аэрозольным барьером, добавить 0,25 мл промывочного раствора 1 и центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин. Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической с отдельным наконечником с аэрозольным барьером, добавить 0,40 мл промывочного раствора 2 и центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин. Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической с отдельным наконечником с аэрозольным барьером, добавить 0,25 мл промывочного раствора 2 и центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин.

Колонки перенести в новые маркированные пробирки, добавить по 0,05 мл элюирующего раствора, инкубировать в твердотельном термостате в течение трех мин, при температуре плюс 45°C, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение двух мин. Полученный раствор, содержащий тотальную РНК, использовать во втором этапе (зона 2).

6.4.3.2 Этап 2 (зона 2).

Для проведения обратной транскрипции следует подготовить набор (достать из морозильника, сверить комплект реагентов) и поместить пробирки с реагентами в штатив со льдом.

Рассчитать необходимое количество реакционной смеси с учетом расхода на одну пробу. Отобрать необходимое количество микропробирок. Приготовить (на льду) необходимое количество реакционной смеси. Для проведения нескольких (N) реакций приготовить ОТ-смесь содержащую в 20 мкл реакционной смеси: 2,7 мкл буфера для ревертазы, 1,6 мкл 10 mM dNTP mix, 0,40 мкл обратного праймера с концентрацией 26 пмоль/мкл, 0,7 мкл ревертазы, 0,33 мкл рибонуклеазного ингибитора и 10 мкл выделенной РНК. После пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек. Центрифугировать на вортексе при 2 тыс. об/мин в течение 1–3 сек. Пробирки выдерживать в термостате при температуре плюс 42°C в течение 1 ч, после чего 10 мин при температуре плюс 72°C, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин. в течение 1–3 сек.

Для проведения амплификации следует отобрать необходимое количество микропробирок, приготовить (на льду) 25 мкл реакционной смеси в: 2,5 мкл буфера для Taq-ДНК полимеразы, 1,25 10 mM dNTP mix – смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, по 0,35 мкл каждого праймера (2-х прямых и одного обратного) с концентрацией 20–26 пмоль/мкл, 2,5 ед. активности термостабильной Taq ДНК-полимеразы. В смесь добавляют 2 мкл кДНК. Затем подписать пробирки в соответствии с их первоначальными обозначениями. Пробирки с подготовленной смесью центрифугировать на вортексе при 2 тыс. об/мин в течение 1–3 с. Не допускать образование пузырьков во время проведения теста. Поместить пробирки в амплификатор и провести амплификацию согласно инструкции по применению амплификатора со сле-

дующей программой температурно-временных циклов: $T_{\text{ден}} 95^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин}$; ($T_{\text{ден}} 94^{\circ}\text{C} - 0,5 \text{ мин}$, $T_{\text{отж}} 57^{\circ}\text{C} - 0,5 \text{ мин}$, $T_{\text{элон}} 72^{\circ}\text{C} - 0,5 \text{ мин}$) – 40 циклов; $T_{\text{элон}} 72^{\circ}\text{C} - 6 \text{ мин}$; $T_{\text{хран}} - 12^{\circ}\text{C}$.

6.4.3.3 Этап 3 (зона 3).

Для проведения электрофоретического анализа продуктов ПЦР следует приготовить рабочий электрофорезный буфер. Для этого к 990 мл воды дистиллированной добавить 10,0 мл раствора для электрофореза и 0,04 мл бромистого этидия.

Агарозу для электрофореза поместить в стеклянную колбу из термостойкого стекла. Добавить рабочий электрофорезный буфер из расчета концентрации агарозы 1,5%. Нагреть колбу со взвесью агарозы в микроволновой печи до полного расплавления агарозы.

На горизонтальный столик для заливки гелей поместить форму, залить расплавленной агарозой и установить гребенку. Толщина геля должна быть не более 0,6 см.

После полного застывания геля (30 минут при комнатной температуре) осторожно осторожно вынимают гребенки, не повредив лунки. Пластину с агарозным гелем поместить в электрофоретическую камеру, расположив лунками к отрицательному электроду. В камеру залить готовый электрофорезный буфер из расчета, чтобы он покрывал гель приблизительно на 1 мм сверху.

Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив. Отобрать 0,01 мл пробы и внести их в лунки геля. В каждом ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен положительный контрольный образец (ПКО), отрицательный контрольный образец (ОКО) и маркер.

Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить напряжение. Электрофорез проводить в течение 30 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 120 В). По завершении электрофореза, выключить источник тока.

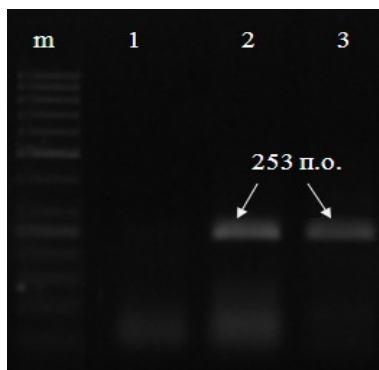
Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины и поместить на экран трансиллюминатора, включить трансиллюминатор.

6.4.3.4 Учет результатов.

Проба с ПКО должна быть видна в ультрафиолетовом свете при длине волны равной 254 нм или 310 нм в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета на уровне 253 п.о. (рисунок 1, проба 2, 3), а с ОКО – должна отсутствовать светящаяся полоса (рисунок 1, проба 1).

Положительным результатом исследуемого образца на геле считается полоса кДНК, наблюдаемая на уровне видимой полосы ПКО (рисунка 1, проба 2), при отсутствии таковой в ОКО (рисунку 1, проба 1) – дорожка на геле пустая.

Длина амплифицированных специфических фрагментов 253 нуклеотидных пар (проба 2,3).



**Рисунок 1 – Интерпретация результатов электрофореза
(1 – ОКО; 2 –ПКО; 3 – исследуемая проба
(штамм вируса коронавирусной инфекции КРС);
m – маркер молекулярного веса**

Результаты положительных контрольных образцов должны укладываться в указанный в инструкции к тест-системе диапазон. Если полученные значения не укладываются в заданный диапазон, то это свидетельствует о неэффективном выделении РНК, неверно приготовленной ПЦР-смеси, а также других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований по изучению культуральных свойств штаммов коронавируса крупного рогатого скота на перевиваемых клетках, определению его инфекционной активности, видовой принадлежности, специфичности, антигенной и генетической идентичности позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать штаммы вируса и использовать их биотехнологическом производстве биопрепаратов и диагностических тест-систем.

Нормативное производственно-практическое издание

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, антигенных,
генетических свойств и инфекционной активности
производственных и эпизоотических штаммов
коронавируса крупного рогатого скота**

Подписано в печать 02.03.2016.
Формат 60x90 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 1,16. Тираж 60 экз. Заказ № 143.
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28
Тел./факс (+375 17) 50 88 131
E-mail: bievvm@tut.by

Отпечатано на полиграфической базе
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»