

**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» *сентября* 2016 г.



**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, инфекционных,
антигенных и генетических свойств
производственных и эпизоотических штаммов
вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота**

МИНСК 2016

Настоящие методические рекомендации по изучению культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных и эпизоотических штаммов вируса парагриппа-3 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 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

Из инфекционных заболеваний крупного рогатого скота парагрипп-3 – одно из наиболее распространенных заболеваний.

Парагрипп-3 крупного рогатого скота (инфекционный бронхит, бронхопневмония, острый катар верхних дыхательных путей, транспортная лихорадка, параинфлуенца-3) – острое контагиозное заболевание к.р.с. (преимущественно молодняка до 6-месячного возраста) характеризующееся катарально-гнойным поражением органов дыхания, лихорадкой, общим угнетением, приступами сухого, болезненного кашля, катаральным конъюнктивитом.

Возбудитель парагриппа-3 крупного рогатого скота – РНК-геномный вирус, относится к семейству *Paramyxoviridae*, роду *Paramyxovirus*. Вирусные частицы – сферической или овальной формы, имеют величину 120–240 нм.

В естественных условиях к вирусу парагриппа-3 восприимчивы различные возрастные группы к.р.с. Однако наиболее часто встречаются сообщения о заболевании молодняка крупного рогатого скота в возрасте до года. Имеются сообщения о выделении вируса парагриппа-3 от взрослых буйволов и буйволят в Египте, овец – в Болгарии, лошадей – в Австралии, коров с поражениями репродуктивных органов – в США. Антитела к вирусу парагриппа-3 обнаруживались у здоровых 96% коров, до 85% – у овец. Также антитела обнаруживались у лошадей, антилоп, бегемотов, коз, обезьян, кур, котиков, собак, крыс, хомячков, мышей. По данным Х. Хараламбиева (1968), резервуаром вируса парагриппа-3 в природе являются овцы.

При экспериментальном инфицировании вирусом парагриппа-3 возможно заразить мышей-сосунков с последующим накоплением вируса в тканях мозга, легких, печени и селезенки в титрах до $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Заражение морских свинок, кроликов, хомячков не приводит к развитию клинических признаков болезни: развивается бессимптомная инфекция. Аналогичное заражение ягнят и поросят бычьим штаммом не приводит к развитию клинических признаков парагриппа-3. Однако инфицированные ягнята и поросята при контакте с крупным рогатым скотом могут служить источником инфекции.

Инкубационный период при парагриппе-3 продолжается от 24–30 часов до 3–5 дней. Различают острое, подострое и хроническое течение. При остром течении наблюдают повышение температуры тела до 41–42 °С, снижение аппетита, поверхностное, учащенное дыхание, кашель, серозные истечения из носа, слезотечение. Выявляют также повышенную чувствительность гортани и трахеи, гиперемии слизистой оболочки носовой полости, бронхопневмонию. Большинство животных выздоравливают в течение 1–2 недель.

В тяжелых случаях на 3–4-й день болезни истечения становятся

гнойнными, слюноотделение более интенсивным, иногда в ротовой полости появляются язвы и эрозии. Животные лежат или стоят с вытянутой вперед шейей, широко расставленными передними конечностями, часто находятся в состоянии прострации, очень угнетены, аппетит у них отсутствует. Прогноз неблагоприятный. Тяжелобольные телята, как правило, погибают.

При подостром течении парагриппа-3 отмечают повышение температуры тела до 40–40,5°C, учащение пульса и дыхания, депрессию, понижение аппетита. Наблюдаются слизисто-гнойные выделения из носа и глаз. Одышка сопровождается сильным, болезненным кашлем, хрипами. Животные часто дышат через рот. Аускультацией и перкуссией устанавливают пневмонию.

При хроническом течении болезни, которая, как правило, является результатом осложнения парагриппа-3 секундарной (условно-патогенной) микрофлорой, регистрируются признаки пневмонии и высокая летальность.

Диагноз на парагрипп-3 ставят комплексно на основании клинико-эпизоотологических данных, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований. Лабораторная диагностика на парагрипп-3 включает в себя проведение следующих исследований: выявление специфического антигена из биологического материала с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) или иммунофлуоресценции (МФА), выделение вируса на культуре клеток и его идентификация в реакциях нейтрализации (РН) и торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА). Сюда же входит реакция связывания комплемента (РСК), иммуноферментный анализ (ИФА), а также ретроспективная диагностика с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного анализа (ИФА), нейтрализации (РН), связывания комплемента (РСК).

Парагрипп-3 дифференцируют от инфекционного ринотрахеита, респираторно-синцитиальной инфекции, вирусной диареи, аденовирусной инфекции, хламидиоза, пастереллеза.

Для лечения используют гипериммунные сыворотки и сыворотки реконвалесценто́в, в которых имеются антитела к вирусу ПГ-3 одновременно с антибактериальными и иммуностимулирующими препаратами. 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.

1 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ И КОНТРОЛЬНЫМ ШТАММАМ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ, ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК, ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН

1.1 Контрольные штаммы вируса парагриппа-3 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 вируса парагриппа-3 может культивироваться *in vitro* на культурах клеток 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 необходимыми 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 парагриппа-3 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 *in vitro* на культуре клеток 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 вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота:

Таблица 1 – Требования к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса в монослое клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК	часы	48–96
2	оптимальная доза заражения	ТЦД ₅₀ /мл	0,2–1,0
3	оптимальное значение pH при репродукции	ед. pH	7,2–7,6
4	оптимальная температура репродукции	град. С	36,0–37,5
5	титр инфекционности после репродукции в монослое клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК	Ig ТЦД ₅₀ /мл	5,5 и выше
6	стерильность	кол-во колоний в мл.	не допускается
7	типоспецифичность	типовая принадлежность	типоспецифичен
8	генетические свойства	генетическая принадлежность	должен соответствовать по генетическим свойствам положительному контролю

2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

Культуры клеток, предназначенные для культивирования вируса парагриппа-3 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 температуре -196°С в течение 10 лет); при температуре 4°С должны храниться до 10 суток (жизнеспособность 90–95%).

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

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

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов вируса парагриппа-3 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 («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;
- CO₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO₂ 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 MEM («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;
- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (фетальная сыворотка), («NuClone» или других изготовителей);
- культура клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК;
- антибиотики (гентамицин с массовой долей 4%, пенициллин, стрептомицин и др. по ТНПА изготовителя).

2.3 Выращивание клеток в монослое.

2.3.1 Реконсервирование клеток.

Для культивирования используют клетки MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК, хранившиеся 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 в матрас объемом 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 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 объемом 100–250 мл, т.е. пересев проводят с коэффициентом 1:2.

На следующем пассаже пересев осуществляют в 1,5-литровом матрасе, 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 стекла монослой клеток снимают 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 свежую ростовую среду и доводят до концентрации 20–35 млн. клеток/мл. В концентрат клеток добавляют 5–7% полиэти-

ленгликоля ММ 6000 и сразу расфасовывают в ампулы, которые запаивают на кислородной горелке или в 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 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота к культивированию.

Материалом для заражения монослойных культур клеток служат штаммы вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота. С учётом титра вируса, указанного в паспортах, музейный вирус разводят питательной средой для выращивания клеток из расчёта $0,5-0,8$ ТЦД₅₀ 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 150 мл поддерживающей питательной среды с антибиотиками: пенициллином и стрептомицином из расчета $100-200$ Ед/мкг каждого.

Инкубацию зараженных клеточных культур проводят при температуре 37°C до появления в монослое специфического ЦПД на $20-25\%$ (48 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 (этикетировать) 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 «Таурис», ПЭК, ЛЭК.

Второй и третий пассаж проводят аналогичным способом. После оттаивания вируса первого пассажа в водяной бане при 40°C его вносят на монослойные культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурис», ПЭК, ЛЭК по 5 мл на матрас или по 10 мл на роллер. Клеточные культуры предварительно отмывают от ростовой среды. Адсорбцию вируса на клетках проводят в течение 60 минут при 37°C , после чего монослой клеток отмывают 2-3 раза питательной средой и вносят в матрас по 150 мл поддерживающей среды с рН $7,5-$

7,6. Инкубируют при температуре 37°C до появления ЦПД на 75–90%. После замораживания-оттаивания и корректировки pH вирусосодержащую жидкость второго пассажа 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 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота.

ЦПД вируса парагриппа-3 проявляется не ранее, чем через 48 часов и характеризуется появлением синтиция и вакуолей.

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

3.1 Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота определяют методом титрования в одной из культур клеток – MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК.

3.2 Последовательные десятикратные разведения вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота от 10^{-1} до 10^{-8} готовят в 24-луночном 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} . После тщательного перемешивания содержимое первой лунки переносят по $0,1 \text{ см}^3$ во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса до 10^{-8} включительно.

Из культурального планшета с выращенным монослоем культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК удаляют 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 контролей служат:

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

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 5-6 день инкубации.

Титр вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота вычисляют по общепринятому методу Рида и Менча [3] и выражают в количестве инфекционных доз, приходящихся на единицу объема ($\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$).

Инфекционная активность производственных штаммов вируса пара-

гриппа-3 крупного рогатого скота должна быть не ниже 5,5 lg ТЦД₅₀/мл.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

4.1 Специфичность штаммов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота определяют в реакции нейтрализации со стандартными гипериммунными сыворотками.

4.2 Для изучения специфичности штаммов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

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

- 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);

- CO₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO₂ 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 MEM («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;

- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (фетальная сыворотка), ("HyClone" или других изготовителей);

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

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

- сыворотка гипериммунная против парагриппа-3 крупного рогатого скота (IDEXX или Nirga);

4.3 Постановка реакции нейтрализации вируса парагриппа-3 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 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота от 10^{-1} до 10^{-8} готовят в 24-луночной планшете. Разведение вируса проводят по методу, описанному в п.3.2.

Затем в каждую лунку стерильного 24-луночного планшета вносят по 0,5 мл каждого разведения вируса и добавляют по 0,5 мл гипериммунной 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 Из планшет с выращенным с выращенным монослоем культур клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используют 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 1:10 и вируса разведении 10^{-2} и так далее до разведения 10^{-8} включительно.

Аналогично вносят на монослой отрицательную сыворотку с различными разведениями вируса.

4.3.3 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 $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$);

- 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 2 суток после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учет проводят на 5-й день инкубации.

4.3.4 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 ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

5.1 Антигенную активность штаммов вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота проводят путем изучения иммунного ответа у лабораторных животных после введения испытуемых вирусов.

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов парагриппа-3 крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

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

- 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 $(37 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ («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);

- CO₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO₂ и температуру нагрева плюс $(37 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- стаканы стеклянные вместимостью 50 см³ ГОСТ 25336;

- пипетки 1, 5, 10 см³ по ГОСТ 29227;

- цилиндр мерный вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770;

- флакон вместимостью 50 см³ 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) («HyClone» или других изготовителей);

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

- штамм вируса парагриппа-3 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 вирус-нейтрализующие антитела к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота, определяемые в реакции нейтрализации. Исследуемый вирус с инфекционным титром не менее $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ в объеме по $3,0 \text{ см}^3$ вводят двукратно с интервалом 21 день внутримышечно каждому из четырех кроликов. Через 21 сутки после вторичной иммунизации у всех животных берут кровь с целью получения проб сывороток для последующего их исследования на наличие вируснейтрализующих антител к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота.

5.4 Постановка реакции нейтрализации с вирусом парагриппа-3 крупного рогатого скота в планшетах.

Реакцию ставят методом разведения испытуемых сывороток с постоянной дозой вируса – $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. 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. Содержимое первых лунок 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 $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$.

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

Из планшетов с выращенным монослоем культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем по $0,2 \text{ см}^3$ смеси сыворотки в разведении 1:2 и вируса, содержащего $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. Затем в следующие 4 лун-

ки 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 СО₂-инкубаторе при 5% СО₂ 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 5-й день инкубации.

Титр антител к вирусу парагриппа-3 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 ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

6.1 Генетическая идентичность и принадлежность штаммов вируса парагриппа-3 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 вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота с помощью тест-системы БелНИИЭВ (ТУ ВУ 600049853.279–2015) 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 (14000 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 наконечники 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 25×15 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;
- таq-полимераза (Tag DNA polymerase) «Fermentas», Литва, кат. номер EP0402;
- магния хлорид (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- сахароза «Sigma», США, кат. номер B21361;

- агароза «Sigma», США, кат. номер А 4679;
- физиологический раствор;
- этидиум бромид«Sigma», США, кат. номер Е 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 парагриппа-3 КРС и в пробах биологического материала от крупного рогатого скота.

6.4 ПЦР- анализ.

6.4.1 Подготовка исследуемой пробы материала.

Штаммы вируса парагриппа-3 в предварительной пробоподготовке не нуждаются.

Для исследования биологического материала используют патматериал, внутренние органы, носовые истечения, фекалии, абортированные плоды, околоплодные воды, цельную кровь.

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.

Фекалии суспензируют в фосфатном буфере, затем центрифугируют 1 мин при 13 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.

6.4.2 Типирование штаммов вируса парагриппа-3 КРС

Используют праймеры синтезированные к области высококонсервативного гена N, кодирующего нуклеопротеид. Локализация нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеопротеид в геноме вируса ПГ-3 соответствует позиции с 1105 до 1217 нуклеотида (данные представлены по последовательности полного гена штамма *Bovine parainfluenza virus 3 iso-*

late 12Q061, complete genome, «JX969001» – номер в базе данных электронного ресурса NCBI).

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 желателно 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.

Расчитать 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, 0,4 мкл обратного праймера с концентрацией 25 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 выдержать 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 прямого и обратного праймеров с концентрацией 25–30 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 следующей программой температурно-временных циклов: T_{ден} 95°C – 2 мин; (T_{ден} 95°C – 30 сек., T_{отж} 57°C – 30 сек., T_{элон} 72°C – 20 сек.) – 40 циклов; T_{элон} 72°C – 6 мин; T_{хран} – 12°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 вынимают гребенки, не повредив лунки. Пластина 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 светящихся полос красно-оранжевого цвета на уровне 113 bp.(рисунок 1, К+), а с ОКО – должна отсутствовать светящаяся полоса (рисунок 1, проба К-). Положительным результатом исследуемого образца на геле считается полоса кДНК, наблюдаемая на уровне видимой полосы ПКО (рисунка 1, проба К+), при отсутствии таковой в ОКО (рисунок 1, проба К-) – дорожка на геле пустая. Длина амплифицированного специфического фрагмента 113 нуклеотидных пар.

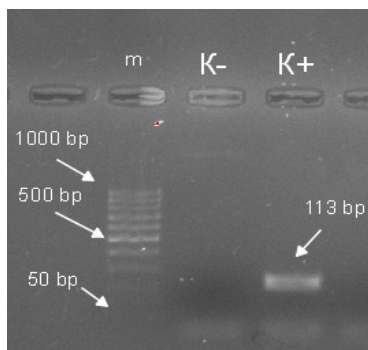


Рисунок 1 – Интерпретация результатов электрофореза

Примечание: K- – отрицательный контрольный образец; K+ – положительный контрольный образец (штамм вируса ПГ-3 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 вируса парагриппа-3 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, инфекционных,
антигенных и генетических свойств производственных
и эпизоотических штаммов вируса парагриппа-3
крупного рогатого скота

Подписано в печать 02.03.2016.
Формат 60x90 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 0,6. Тираж 60 экз. Заказ № 142.
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28
Тел./факс (+375 17) 50 88 131
E-mail: bievm@tut.by

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