

**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 реовирусного теносиновита птиц**

МИНСК 2016

Настоящие методические рекомендации по изучению культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных и эпизоотических штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц подготовили:

**Насонов И. В.** – заведующий отделом болезней птиц, пчёл и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, доцент;

**Радюш И. С.** – старший научный сотрудник отдела болезней птиц, пчёл и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

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

**Реовирусная инфекция кур** (теносиновит кур, вирусный артрит, «слабость ног», синовит, артрит) – контагиозное заболевание, вызываемое РНК-геномным вирусом, относящимся к сем. *Reoviridae*. Заболевание в настоящее время распространено во всех странах с развитым птицеводством. Наиболее часто реовирусный теносиновит регистрируется среди кур мясного направления и индюшат.

Теносиновит кур (ТСК) характеризуется хромотой, связанной с воспалением сухожилий и суставов конечностей, высокой ранней смертностью (6–30%), плохим ростом, снижением яйценоскости (на 15–20%) и выводимости цыплят. При хроническом течении болезнь сопровождается разрывом сухожилий голени и эрозией суставных хрящей. У разных возрастных групп птиц симптомы болезни различны: у 5–8-недельных цыплят вначале появляются отёки сухожильных влагалищ и кровоизлияния в них, в полости суставов накапливается выпот. Ведущий клинический признак – разрыв сухожилий конечностей – чаще регистрируется у взрослой птицы в области голени. Это приводит к кровотечению, а затем и некрозу концов сухожилий. При ТСК может поражаться желудочно-кишечный тракт и яичники, отмечаются желточные перитониты и атрофия яичников. Во внутренних органах обнаруживают катаральный энтерит, увеличение почек, гиперемию поджелудочной железы, дряблость сердечной мышцы.

Восприимчивость птиц к вирусу зависит от возраста, условий кормления, ухода, содержания и вирулентности возбудителя. Наиболее чувствительны суточные цыплята. Возбудитель длительное время циркулирует среди птиц неблагополучного хозяйства. Заболевание протекает в виде энзоотических вспышек, особенно среди вновь завозимого поголовья. Источником инфекции является больная и переболевшая птица. Наибольшее количество возбудителя находится в помёте. Заражение осуществляется алиментарным путем, также установлена трансовариальная передача вируса. Куры-несушки начинают нести контаминированные яйца уже через 19 дней после заражения. Отмечается длительное вирусоносительство – вирус удавалось выделить от птиц через 289 суток после заражения. Большую опасность в распространении возбудителя представляют отходы инкубации.

Различают несколько серотипов реовирусов птиц. Высказано предположение о существовании не менее 11 серотипов этого вируса. Реовирус 3-го типа выделен от цыплят, больных ТСК. Локализуется вирус, в основном, в сухожилиях разгибателей и сгибателей фаланг.

Культивируется реовирус на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), в первичной культуре клеток почки цыплят, в первичной культуре фибробластов эмбрионов кур (ФЭК), культуре клеток почки африканской зелёной мартышки *Vero* и др. с формированием больших синцитиев и эозинофильных цитоплазматических телец-включений.

Для специфической профилактики ТСК применяют как живые, так и

инактивированные вакцины. Иммунизируют, главным образом, кур-несушек. Цель создания напряжённого иммунитета в родительском стаде – снижение трансвариальной передачи возбудителя и получение достаточно уровня пассивного иммунитета у цыплят с первого дня жизни.

Для конструирования вакцин и диагностических тест-систем требуются аттестованные и депонированные производственные штаммы вируса реовирусного теносиновита птиц.

В настоящих методических рекомендациях приведены требования и описаны методы изучения культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц.

## **1 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ И КОНТРОЛЬНЫМ ШТАММАМ ВИРУСА РЕОВИРУСНОГО ТЕНОСИНОВИТА ПТИЦ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ, ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН**

1.1 Контрольные штаммы реовирусного теносиновита птиц должны иметь характерные (в рамках семейства или рода) морфологические, биологические свойства, обладать генетически закрепленным уровнем вирулентности, антигенной и иммуногенной активности.

1.2 Штамм вируса должен культивироваться *in vitro* (в условиях, обеспечивающих его чистоту в отношении контаминантов) или в организме естественно восприимчивого животного, генетические свойства штамма не должны изменяться в течение 10 пассажей на соответствующей системе культивирования.

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 Ig в течение 12 месяцев).

1.5 Для изготовления живых и инактивированных вакцин против реовирусного теносиновита птиц используют штаммы вирусов, обладающие пониженной вирулентностью, умеренной реактогенностью, безвредностью и иммуногенностью для естественно восприимчивых животных всех возрастов, не способные к реверсии в сторону вирулентности у естественно восприимчивых животных на протяжении 6 последовательных пассажей.

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 птиц разных возрастных групп.

1.8 Необходимые требования к вирусу реовирусного теносиновита птиц:

Таблица 1 – Требования к вирусу реовирусного теносиновиита птиц

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса: в монослое культуры клеток <i>Vero</i> и ФЭК в РКЭ	часы	44–48 72–120
2	оптимальная доза заражения: для культуры клеток <i>Vero</i> и ФЭК для РКЭ	ТЦД <sub>50</sub> /кл ЭИД <sub>50</sub> /0,2 см <sup>3</sup>	0,1–0,5 100–1000
3	оптимальное значение рН при репродукции	ед. рН	7,2–7,6
4	оптимальная температура репродукции: для культуры клеток <i>Vero</i> и ФЭК для РКЭ	°С	36,5–37,5 37,7–38,0
5	титр инфекционности после репродукции: в монослое культуры клеток <i>Vero</i> и ФЭК в РКЭ	lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	5,5 и выше 6,0 и выше
6	стерильность	кол-во колоний/см <sup>3</sup>	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 РЕОВИРУСНОГО ТЕНОСИНОВИТА ПТИЦ НА ПЕРВИЧНЫХ, ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ И РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования вируса реовирусного теносиновиита птиц:

Клетки предназначены для лабораторного культивирования вируса реовирусного теносиновиита птиц 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 минус 196°С в течение 10 лет); при температуре плюс 4°С должны храниться до 10 суток (жизнеспособность 90–95%).

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

Клетки должны быть свободны от контаминантов, количество кото-

рых контролируется посевами на элективные среды, окраской оливомицитином и акридином оранжевым.

2.2 Общие требования к развивающимся куриным эмбрионам (РКЭ) для культивирования вируса реовирусного теносиновита птиц.

Эмбрионы, используемые для выделения реовируса птиц из патматериала, а также для получения вирусосодержащего сырья на основе производственных штаммов, должны быть получены из хозяйств, благополучных по инфекционным болезням, в том числе и по реовирусной инфекции птиц, скорлупа должна быть непигментированной, чистой (мыть нельзя), без трещин и насечек, без наложений или мраморности, возраст эмбриона должен соответствовать избранному методу заражения (Белоусова Р. В., Троценко Н. И., Преображенская Э. А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: Колос С. – 2006. – 248 с.).

Поставленная задача достигается способом отбора куриных эмбрионов, включающим визуальную оценку яиц, учёт массы и индекса формы перед закладкой в инкубацию, отличающимся тем, что эмбрионы дополнительно оценивают по интенсивности их развития в 18–19 и 63–64 ч инкубации, причём разница диаметров зародыша куриного эмбриона должна находиться в диапазоне 1,0–1,5 см, а диаметр сосудистого поля желточного мешка должен быть не менее 2 см.

Технический результат – предлагаемый способ позволяет увеличить объём получаемой экстраэмбриональной жидкости и повысить титр вируса.

2.3 Для изучения культуральных свойств штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц используют следующие реактивы и оборудование:

- натрий хлористый, «х.ч.», ГОСТ 4233-77;
- питательные среды Игла, ГЛА, DMEM, («Sigma»), раствор Хенкса, раствор версена с массовой долей 0,02% и раствор трипсина с массовой долей 0,25% («Sigma», «Gibco»);
- бензилпенициллина натриевая соль (бензилпенициллин), стрептомицин, амфотерицин В, раствор гентамицина с массовой долей 10%, раствор метронидазола с массовой долей 0,5% и др. по ТНПА производителя;
- эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) («Sigma» или других производителей);
- сыворотка крови крупного рогатого скота;
- раствор натрия хлорида (ГОСТ 4233-77) с массовой долей 0,9% (готовят по общепринятой методике);
- йод, ГОСТ 545-76;
- парафин, ГОСТ 23683-89;
- спирт этиловый ректификованный технический марки «Экстра М», ТУ ВУ 700068910.014-2005;
- инкубаторы для куриного яйца, вместимостью 2000 яиц (Maino enrico, Италия);
- инвертированный микроскоп Eclipse TS 100F/TS 100F LED (Nicon, Япония) или др. производителей;

- термостаты с температурой нагрева плюс  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  и от плюс  $20^\circ\text{C}$  до плюс  $24^\circ\text{C}$ ;

- холодильник бытовой;
- шкаф ламинарный (Labconco, США);
- пипетки мерные 2-1-2-1, 2-1-2-2, 2-1-2-5, 2-2-2-10, ГОСТ 29228-91;
- спринцовка пластизольная, ТУ 33.1-24681750-003-2001;
- мешалка магнитная ММ-5, ТУ 25-11.834-80;
- Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BIOSAN, EC);
- колба плоскодонная;
- центрифуга Centra C15 (Thermo Electron Corporation, США или др. производителей);
- центрифужные пробирки;
- наконечники полимерные 1-разовые к дозаторам пипеточным  $0,25 \text{ мм}^3$ ,  $0,5\text{--}250 \text{ мм}^3$ ,  $0,5\text{--}5 \text{ см}^3$  и  $1\text{--}10 \text{ см}^3$ ;
- чашка Петри с крышкой пластмассовая 1-кратного применения, ТУ ВУ 500043647.007-2010;
- чашка ЧБН-2 (Петри), ГОСТ 23932-90 (Украина);
- камера Горяева 2-сеточная, ТУ 9443-007-29508133-2007 и стекло к камере Горяева универсальное;
- матрасы Tissue Culture Flask объёмом 50, 250 и  $600 \text{ см}^3$ ;
- шприцы медицинские многократного применения, ГОСТ 22967-90;
- иглы инъекционные многократного применения, ГОСТ 25377-82;
- овоскоп;
- спиртовка, ГОСТ 25336-82;
- пробойник металлический;
- ножницы тупоконечные прямые 140 мм, ножницы с одним острым концом прямые 140 мм, ножницы глазные вертикальноизогнутые, остроконечные 113 мм, ТУ 64-1-64-78;
- пинцеты медицинские, ГОСТ 21241-89;
- кипятильник дезинфекционный П-40-1, ТУ 64-1-106-81;
- вата медицинская гигроскопическая хирургическая, ГОСТ 5556-81;
- марля, ГОСТ 9412-93;
- СПФ РКЭ;
- культура клеток *Vero*;
- DMSO, глицерин.

#### 2.4 Выращивание клеток в монослое.

2.4.1 Получение первичной культуры фибробластов эмбрионов кур (ФЭК).

Инкубацию яиц проводят согласно «Методическим рекомендациям по инкубации яиц сельскохозяйственной птицы» г. Сергиев Посад, 2001. Для инкубации отбирают яйца весом не менее 52 г, без микротрещин на скорлупе. Перед закладкой в инкубатор яйца подвергают дезинфекции парами формальдегида. Через 10 суток инкубации все эмбрионы овоскопируют и проводят визуальный контроль их развития, для работы отбирают яйца с

подвижными эмбрионами и хорошо выраженными сосудами, на скорлупе отмечают границу воздушной камеры.

Получение первично-трипсинизированной культуры ФЭК осуществляют по следующей методике: поверхность скорлупы обрабатывают спиртовым раствором йода с объёмной долей 0,5% и обжигают спиртовым факелом. В стерильных условиях из яйца извлекают эмбрион, удаляют голову, конечности и внутренние органы. Кожно-мышечный мешок помещают в чашку Петри, 3 раза промывают раствором Хенкса с антибиотиками и измельчают ножницами на кусочки размером 1–3 мм. Измельчённую ткань снова промывают в растворе Хенкса с антибиотиками от слизи и кровяных элементов, переносят в плоскодонную колбу. В колбу вливают подогретый до температуры плюс 37°C раствор версена с массовой долей 0,02% с раствором трипсина «Gibco» с массовой долей 0,25% pH 7,4–7,6 (10:1) и помещают в шейкер-инкубатор при температуре плюс 37°C на 15 мин. Скорость вращения регулируют так, чтобы не наступало вспенивания содержимого колбы (130 RPM). Затем суспензии дают осесть на дно колбы, а надосадок сливают во флакон, добавляя к нему 5–6% к объёму суспензии ЭТС или сыворотки крови крупного рогатого скота для нейтрализации трипсина. Осадок вновь ресуспензируют подогретой смесью раствора версена с массовой долей 0,02% и раствора трипсина с массовой долей 0,25% (9:1), ставят в шейкер-инкубатор и повторяют процедуру до полного истощения ткани, собирая надосадок. После окончания трипсинизации полученную взвесь клеток фильтруют через 3-слойный марлевый фильтр и центрифугируют 10 мин при 130g. Надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспензируют в питательной среде Игла и ГЛА (1:1), подогретой до температуры плюс 37°C и отбирают пробу для подсчёта клеток. Количество клеток рассчитывают по формуле:

$$X = Q \times 1000 \times 20 : 0,9, \text{ где}$$

X – число клеток в 1 см<sup>3</sup> суспензии;

Q – среднее число клеток в счётной камере по результатам подсчёта в 2 пробах;

1000 – число мм<sup>3</sup> в 1 см<sup>3</sup>;

20 – коэффициент разведения исходной клеточной суспензии;

0,9 – объём счётной камеры Горяева в см<sup>3</sup>.

Процент жизнеспособных клеток подсчитывают по формуле:

$$\% \text{ клеток} = (A - B) : a \times 100, \text{ где}$$

% клеток – процент жизнеспособных клеток;

A – общее число клеток;

B – число мёртвых клеток;

100 – коэффициент.

Исходя из полученного количества клеток, рассчитывают посевную



концентрацию клеток для получения 100% монослоя ФЭК через 24–48 ч. Для посева в матрасы объёмом 1,5 дм<sup>3</sup>, готовят рабочую суспензию клеток с концентрацией  $6-8 \times 10^5/\text{см}^3$  на питательной среде Игла и ГЛА (1:1) с содержанием 10% ЭТС или сыворотки крови крупного рогатого скота и разливают по 150 см<sup>3</sup>.

#### 2.4.2 Получение монослоя перевиваемой культуры клеток *Vero*

Для культивирования используют клетки *Vero* хранившиеся в жидком азоте (при температуре минус 196°С) в ампулах объёмом 10–75 см<sup>3</sup> или в морозильнике при температуре минус 70°С, в пластиковых флаконах объёмом от 100 до 500 см<sup>3</sup>. Ампулы или флаконы с суспензией клеток извлекают из хранилища, помещают в водяную баню с температурой плюс 37°С и выдерживают до полного оттаивания.

В боксе ампулы протирают тампоном, смоченным в 70% спирте, запаянный конец ампулы надрезают пилкой, отламывают, суспензию клеток переносят во флаконы стерильным шприцем; разводят в 5–10 раз ростовой питательной средой, добавляя её небольшими порциями для предотвращения осмотического шока клеток в 4 приема с интервалом в 1 минуту. Переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 150g в течение 5 мин. Сливают супернатант и ресуспензируют клетки в ростовой среде. Отбирают пробу для контроля стерильности и подсчёта клеток.

Концентрацию клеток подсчитывают в камере Горяева под малым увеличением микроскопа. К 1 см<sup>3</sup> клеточной взвеси добавляют равный объём 0,2% раствора трипановой сини, тщательно перемешивают и заправляют камеру. Количество клеток в 1 см<sup>3</sup> суспензии определяют по формуле:

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

X – количество клеток в 1 см<sup>3</sup>;

A – общее количество клеток в камере;

B – разведение суспензии.

После реконсервации суспензию клеток доводят питательной средой для монослойного выращивания до концентрации  $0,6-1,3 \times 10^5$  кл/см<sup>3</sup> жизнеспособных клеток после чего высевают в 100–250 см<sup>3</sup> матрас.

Клетки выращивают 12–168 ч при pH 7,0–7,4 и температуре плюс 37°С, поддерживая pH среды раствором натрия гидрокарбоната с массовой долей 7,5%. Сформировавшийся монослой для проведения последующих пассажей снимают бесцентрифужным способом. Из матрасов удаляют ростовую среду, пласт клеток дважды ополаскивают смесью раствора версена с массовой долей 0,02% и раствора трипсина («Sigma») с массовой долей 0,25% (100:1,3 по объёму соответственно). Культуру укладывают пластом вверх, в таком положении она находится 3–15 минут. Все манипуляции проводят при температуре плюс 37°С, растворы и среда также должны иметь температуру плюс 37°С.

Отслоившиеся от стекла клетки ресуспендируют в небольшом коли-

честве питательной среды ( $50 \text{ см}^3$ ) путём энергичного встряхивания, затем добавляют удвоенное количество питательной среды с содержанием 10% сыворотки крови крупного рогатого скота или 10% ЭТС. Суспензию клеток с одного матраса высевают в четыре  $100\text{--}250 \text{ см}^3$  матраса, т. е. пересев проводят с коэффициентом 1:4.

На следующем пассаже пересев осуществляют в  $1,5 \text{ дм}^3$  матрас ( $10 \text{ млн кл/матрас}$ ), проводя все операции как описано выше. Таким образом, проводят ещё 2–3 пассажа, каждый раз увеличивая количество матрасов в 4–6 раз, в течение которых клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства.

#### 2.4.3 Криоконсервирование клеток.

Для успешного криоконсервирования клеток *Vero*, выращенных в монослое, необходимо брать их в конечной стадии логарифмического роста. Монослой дважды промывается раствором. С монослоя клетки снимаются смесью раствора версена с массовой долей 0,02% и раствора трипсина («Sigma») с массовой долей 0,25% ( $100:1,3$  по объёму соответственно). Полученная суспензия клеток должна иметь жизнеспособность не менее 95–100%. Для концентрирования и частичного освобождения суспензии от отработанной среды, её центрифугируют при  $150g$  в течение 5 мин. Супернатант удаляют, клеточный осадок растворяют в среде с криопротектором (50% среды DMEM, 40% ЭТС, 10% криопротектора (DMCO или глицерин)) из расчёта  $5 \times 10^6\text{--}1 \times 10^7$  клеток на  $1 \text{ см}^3$  объёмозамораживающих ампул). Экспозиция с криопротектором до начала замораживания не должна превышать двух часов. Клеточную суспензию распределяют в ампулы для замораживания и помещают в воздушную фазу отделения сосуда с жидким азотом или в полистироловую коробку.

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

2.5 Культивирование штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц в культуре клеток *Vero*, ФЭК и в РКЭ.

Материалом для заражения монослойных культур служат изучаемые или музейные штаммы вируса реовирусного теносиновита птиц. С учётом титра вируса, указанного в паспортах, музейный вирус разводят разводят стерильной поддерживающей питательной средой из расчёта  $4\text{--}6 \text{ лг ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

Приготовленный вирусный материал в дозе  $0,1\text{--}0,5 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$  инокулируют в матрасы с культурой клеток, которые предварительно дважды

отмывают раствором Хенкса от остатков ростовой среды. Оставляют матрасы при температуре 37°C в течение 60 минут для адсорбции вируса на клетках. После указанной экспозиции в матрасы вносят по 100–150 см<sup>3</sup> поддерживающей среды с антибиотиками: пенициллином 100 ЕД/см<sup>3</sup> и стрептомицином 50 мкг/см<sup>3</sup>.

Инкубацию заражённых клеточных культур проводят при температуре плюс 37° С до специфического поражения монослоя (ЦПД) на 80% (44–48 ч). После замораживания и оттаивания при комнатной температуре культуральную вирусосодержащую жидкость сливают в одну ёмкость, освещают низкоскоростным центрифугированием при 600g в течение 20 мин, рН суспензии доводят до 7,4–7,6. Из каждого сосуда отбирают пробы в количестве 10 см<sup>3</sup> для определения биологической активности вируса, контроля стерильности и отсутствия гемагглютинации. Вирусную суспензию до получения результатов контроля на стерильность и определения активности хранят при температуре не выше плюс 4°C не более 15 суток.

При подтверждении соответствия качества материала требованиям его расфасовывают в пенициллиновые флаконы по 10 см<sup>3</sup>, маркируют (этикетировать) и хранят при минус 40°C.

При освежении лиофилизированного вирусного материала его разводят на питательной среде с рН 7,4–7,6 и выращивают в матрасах с монослойной культурой клеток *Vero*, ФЭК.

Для получения второго и третьего пассажа реовирус первого пассажа размораживают при комнатной температуре и заражают им монослойные культуры клеток *Vero*, ФЭК в дозе 0,1–0,5 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Клеточные культуры предварительно отмывают от ростовой среды раствором Хенкса. Выдерживают зараженный реовирусом монослой в течение 60 минут, после чего заливают питательной средой с рН 7,5–7,6 на 1/10 объёма культурального сосуда. Инкубируют при температуре плюс 37°C до проявления ЦПД на 80–90%. После замораживания-оттаивания и корректировки рН вирусосодержащую жидкость в необходимом количестве фасуют в пенициллиновые флаконы по 10 см<sup>3</sup>, а остальной вирусный материал – по 100–300 см<sup>3</sup> и хранят при температуре минус 40°C.

Заражение СПФ РКЭ реовирусом птиц проводят в 9–11-суточном возрасте в аллантаоисную полость в объёме 0,2 см<sup>3</sup> в дозе 3,0 lg ЭИД<sub>50</sub>. Заражённые РКЭ инкубируют 48–120 ч при температуре плюс 37,5±0,5°C и относительной влажности воздуха 60–70% в вертикальном положении пугой вверх. Ежедневно проводят овоскопирование и отбор павших эмбрионов. Эмбрионы, павшие в течение первых 24 ч уничтожают, считая их гибель неспецифической. Эмбрионы, оставшиеся в живых и погибшие в период 48–120 ч охлаждают при температуре плюс 4±2°C в течение 16 ч. Перед вскрытием эмбрионы выдерживают 2–3 ч при комнатной температуре для испарения конденсата на скорлупе. Поверхность скорлупы обрабатывают спиртовым раствором йода с объёмной долей 0,5% и обжигают спиртовым факелом. В стерильных условиях отбирают ХАО и экстраэмбриональную

жидкость от каждых 5–7 эмбрионов в стерильную, плотно закрывающуюся емкость. Полученный материал измельчают в ступке со стерильным песком или с помощью гомогенизатора, центрифугируют в течение 20 мин при 600g, затем надосадочную жидкость фильтруют во флаконы через 3-слойный марлевый фильтр, стерильно собирают во флаконы объёмом 200–400 см<sup>3</sup>; добавляют антибиотики: гентавет (10 мг/100 см<sup>3</sup>) и раствор метронидазола с массовой долей 0,5% (0,15 см<sup>3</sup>/100 см<sup>3</sup>), и выдерживают в течение 3–12 ч при температуре плюс 3±1 °С.

2.6 Характерные изменения систем культивирования под воздействием вируса реовирусного теносиновита птиц.

Первые признаки ЦПД вируса реовирусного теносиновита птиц при культивировании с использованием культур клеток *Vero* и ФЭК могут проявляться через 24–30 ч и характеризуются округлением клеток, зернистостью их цитоплазмы, образованием синцитиев и очагов отслоения клеток от субстрата.

При культивировании в РКЭ первые признаки поражения эмбрионов могут наблюдаться на 3 сутки. При вскрытии инфицированных СПФ-эмбрионов наблюдают отставание их в росте и развитии, кровоизлияния в области затылка, спины и на лапках зародыша; наличие поражений внутренних органов: дегенерация миокарда (миокард цвета «вареного мяса»), печень зеленовато-глинистая, увеличена, с некротическими очажками по краям органа, желчный пузырь напряжён, почки увеличены. Отмечается утолщение и некроз ХАО.

### **3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА РЕОВИРУСНОГО ТЕНОСИНОВИТА ПТИЦ**

Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц определяют методом титрования в культуре клеток *Vero*, ФЭК или СПФ РКЭ.

#### **3.1 Определение титра реовируса на культуре клеток.**

Последовательные десятикратные разведения вируса реовирусного теносиновита птиц от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup> готовят в 24-луночной планшете. Для этого в 8 лунок вносят по 0,9 см<sup>3</sup> питательной среды. Затем в первую лунку вносят 0,1 см<sup>3</sup> нативного вируса, получая его разведение 10<sup>-1</sup>. Жидкость в первой лунке тщательно пипетируют дозатором и переносят 0,1 см<sup>3</sup> во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса 10<sup>-8</sup> включительно.

Биологическую активность реовируса определяют с использованием суспензии первичной культуры клеток ФЭК или перевиваемой культуры клеток *Vero* в концентрации 5–8×10<sup>5</sup> кл/см<sup>3</sup> или 2,5–3×10<sup>5</sup> кл/см<sup>3</sup> соответственно, которую вносят по 100 мм<sup>3</sup> в каждую лунку 96-луночного культурального планшета с плоским дном.

Подготовленные разведения реовируса переносят в культуральный

планшет по 100 мм<sup>3</sup> в лунку с культурой клеток. На каждое разведение используют не менее 4 лунок. Оставляют на 30–60 минут при температуре плюс 37°С, затем добавляют в каждую лунку по 100 мм<sup>3</sup> поддерживающей питательной среды. Реакцию сопровождают контролем клеток – лунки с культурой клеток этой же партии, в которые вносят поддерживающую питательную среду в объёме 200 мм<sup>3</sup>. После этого планшеты помещают в СО<sub>2</sub>-инкубатор (СО<sub>2</sub> 5%) при температуре плюс 37°С.

Учет реакции проводят путём микроскопирования монослоя клеток спустя 2 суток после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учёт проводят на 6–7 день инкубации по проявлению специфической деструкции в заражённой культуре клеток при отсутствии таковой в контроле.

Титр вируса реовирусного теносиновита птиц вычисляют по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражают в lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Инфекционная активность производственных штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц должна быть не ниже, чем 5,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

### 3.2 Определение титра реовируса птиц в СПФ РКЭ.

Для этого из общей пробы вирусосодержащей жидкости отбирают 1 см<sup>3</sup>, из отобранной пробы готовят последовательные 10-кратные разведения вирусосодержащего материала (10<sup>-1</sup>–10<sup>-8</sup>) на стерильном растворе натрия хлорида с массовой долей 0,9%. Для этого в 8 стерильных флаконов объёмом 10 см<sup>3</sup> номеруют по порядку и вносят в каждый по 9 см<sup>3</sup> раствора натрия хлорида с массовой долей 0,9%, затем в первый флакон с помощью дозатора вносят 1 см<sup>3</sup> вирусосодержащего материала в разведении 10<sup>0</sup>, не касаясь жидкости во флаконе, получая, таким образом, разведение вируса 10<sup>-1</sup>. Меняют наконечник дозатора, тщательно пипетируют жидкость во флаконе №1, затем отбирают 1 см<sup>3</sup> вирусосодержащего материала и переносят во второй флакон, не касаясь жидкости во флаконе, получая разведение 10<sup>-2</sup>. Далее поступают как указано выше. Путём последовательных переносов вируса получают ряд разведений вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup> включительно. Полученные разведения используют для заражения 10-суточных СПФ РКЭ – не менее 4 эмбрионов на каждое разведение в объёме 0,2 см<sup>3</sup> в аллантоисную полость. Опыт сопровождается контролями:

1) эмбрионы, которым в аллантоисную полость вводят 0,2 см<sup>3</sup> раствора натрия хлорида с массовой долей 0,9%, на котором готовят разведения вируса – не менее 4 шт.;

2) эмбрионы, с которыми не проводят никаких манипуляций – не менее 4 шт.

За эмбрионами ведут ежедневный контроль в течение 5 суток методом овоскопирования, отбора павших, вскрытия и анализа наблюдающихся изменений. Эмбрионы, павшие в течение первых суток после заражения не учитываются – их гибель считается не специфической.

#### 4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА РЕОВИРУСНОГО ТЕНОСИНОВИТА ПТИЦ

Специфичности штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц определяют в реакции нейтрализации.

Для изучения специфичности штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц используют следующие реактивы и оборудование:

- антиген реовирус;
- сыворотка крови кур;
- аппарат для промывки планшетов MINI-WASHER-350 («Organon Teknika», Нидерланды или других изготовителей);
- планшет культуральный однократного применения 96-луночный (Tissue Culture Plate 96 Well Flat Bottom with Lid, США или других производителей);
- планшет полимерный для иммунологических реакций однократного применения;
- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020-0,20, 0,20-1,0 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> и до 1,0 см<sup>3</sup> («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);
- CO<sub>2</sub>-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO<sub>2</sub> и температуру нагрева плюс (37±1,0)°С (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);
- пипетки 1, 5, 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 29227;
- цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770;
- флакон вместимостью 50 см<sup>3</sup> по действующим ТНПА;
- среда DMEM, («Sigma», США) или других изготовителей;
- среда Игла производства фирмы «Sigma» или других изготовителей;
- культуры клеток *Vero* из банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского» первично-трипсинизированная культура ФЭК.

Для постановки реакции используют первичную культуру ФЭК или перевиваемую культуру клеток *Vero* 24–48 ч культивирования. Готовят

10-кратные разведения антигена, начиная с 1:5, 1:50, 1:500 и т.д. К каждому разведению антигена добавляют постоянный объём сыворотки, при этом конечные разведения антигена будут 1:10, 1:100, 1:1000 и т.д. Время контакта антигена с сывороткой составляет 1 ч при комнатной температуре. Затем смесь вируса и сыворотки вносят в лунки культурального планшета с культурой клеток. Каждым разведением инфицируют по 4 пробирки и инкубируют их при температуре 37°C в течение 6–7 суток. Параллельно проводят титрацию антигена без сыворотки и/или с добавлением отрицательной сыворотки крови кур. Учёт реакции проводят микроскопически с учётом характерного для реовируса птиц ЦПД в культуре клеток в контроле (округление клеток, наличие зернистости в них, образования синцития и гибель клеток).

Вируснейтрализующую активность сыворотки выражают в индексе нейтрализации, который представляет собой разность показателей титра вируса в Ig в присутствии специфической и нормальной сывороток.

При определении титра сыворотки РН ставят в следующем варианте: готовят 2-кратные разведения сывороток 1:2–1:256) и к ним добавляют вирус в дозе 3 lg ТЦД<sub>50</sub>/0,2 см<sup>3</sup>. Время контакта смеси составляет 1 ч при комнатной температуре, после чего смесь вносят в биологическую тест-систему. За титр антител принимают то наибольшее разведение сыворотки, которое способно ингибировать репродукцию вируса в 50% заражённых культурах клеток.

Вирус считают активным при условии, что титр антител в сыворотках крови привитых кур в реакции нейтрализации составляет не ниже 1:40.

## **5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА РЕОВИРУСНОГО ТЕНОСИНОВИТА ПТИЦ**

Антигенную активность штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц проводят путём изучения иммунного ответа у лабораторных животных после введения испытуемых вирусов.

Для изучения антигенной активности штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц используют следующие реактивы и оборудование:

- набор для определения антител к вирусу реовирусной инфекции кур методом ИФА фирмы «IDEXX» (Нидерланды) или др. производителей;
- спирт этиловый ректификованный технический марки «Экстра М», ТУ ВУ 700068910.014-2005;
- полуавтоматический планшетный фотометр Stat Fax-2100 (Awareness Technology, США) или др. аналоги;
- аппарат для промывки планшетов MINI-WASHER-350 («Organon Teknika», Нидерланды или др. производителей);
- 8-канальный дозатор пипеточный переменного объёма Лайт с диапазоном дозирования 50–300 мм<sup>3</sup>, 1-канальные дозаторы переменного объёма Лайт с диапазоном измерения 2–20 мм<sup>3</sup>, 20 – 200 мм<sup>3</sup>, 100–1000 мм<sup>3</sup> и

1–10 см<sup>3</sup>, ТУ 9443-007-33189998-2007;

- наконечники полимерные 1-разовые к дозаторам пипеточным 0,25 мм<sup>3</sup>, 0,5–250 мм<sup>3</sup>, 0,5–5 см<sup>3</sup> и 1–10 см<sup>3</sup>;

- чашка Петри с крышкой пластмассовая 1-кратного применения, ТУ ВУ 500043647.007-2010;

- пробирки Эппендорфа полипропиленовые для микропроб объемом 0,5 см<sup>3</sup> и 1,5 см<sup>3</sup>;

Для определения антигенной активности реовируса птиц 20 SPF-цыплят 7–10-суточного возраста иммунизируют внутримышечно в верхнюю часть внутренней стороны бедра в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. 10 SPF-цыплят того же возраста не подвергают вакцинации (контрольная группа). Через 21 сутки после вакцинации индивидуальные сыворотки, полученные из крови цыплят до и после вакцинации исследуют на наличие антител против птичьего реовируса методом ИФА согласно инструкции к набору. Сыворотки крови считаются положительными при наличии антител к реовирусу птиц в титре не ниже 1:800.

## **6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА РЕОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПТИЦ**

Генетическая идентичность и принадлежность штаммов вируса реовирусной инфекции птиц (*A. orthoreovirus*) определяется с использованием тест-системы VetPCR *A. orthoreovirus* (BioinGentech) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологических пробах с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

### **6.1 Комплектация**

1 *A. orthoreovirus* RT-PCR Pre-смесь (VetPCR™);

2 *A. orthoreovirus* PCR Pre-смесь (VetPCR™);

3 RT-PCR раствор (Brig™);

4 Раствор транскриптазы (Biotech™);

5 Вода освобожденная от РНКаз и ДНКаз;

6 *A. orthoreovirus* положительный контроль;

7 Отрицательный контроль;

8 Внутренний контроль;

9 Минеральное масло;

10 Маркер молекулярной массы (Brig™);

11 Набор для выделения РНК.

### **6.2 Транспортирование и хранение**

Тест-систему можно транспортировать при температуре от 15°C до 25°C, так как содержит химические стабилизаторы. Хранить при температуре минус 20°C. Работать с данной тест-системой при температуре 4°C.

### **6.3 Принцип метода**

Метод обнаружения РНК вируса реовирусной инфекции птиц основан на амплификации специфического участка кДНК, полученной из РНК,



за счет многократного повторения циклов денатурации кДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей кДНК с помощью фермента Таq-полимеразы. Результат амплификации кДНК вируса реовирусной инфекции птиц регистрируется в режиме реального времени на каналах JOE/Yellow, FAM/Green.

#### 6.4 Порядок отбора и подготовки проб

Тест-система предназначена для выявления РНК вируса реовирусной инфекции птиц в биологическом материале методом ПЦР.

Для исследования генома вируса реовирусной инфекции птиц используют следующий биологический материал:

- кровь;
- паренхиматозные органы павших или вынужденно убитых птиц;
- смывы с верхних дыхательных путей.

#### Отбор материала для исследования

Кровь для исследования отбирают в объеме 0,2 мл в пробирки с предварительно налитым 6 % раствором ЭДТА из расчета 10:1.

Из тканей и органов вырезают кусочки размером 0,5–1 см<sup>3</sup> (толщина кусочков может быть меньше).

Материал доставляют в лабораторию в день взятия или на следующий день, сохраняя при температуре от 2°C до 8°C. Допускается хранение материала при температуре не выше минус 16 °C в течение 30 дней.

#### 6.5 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);
- камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия);
- ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия);
- микроволновая печь для плавления агарозы;
- колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл;
- мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74);
- 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 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);
- 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 см<sup>2</sup>;
- ножницы остроконечные;
- пинцеты хирургические и анатомические;
- шприцы типа «Рекорд» ГОСТ 22967-97 – 1 мл и 5 мл;
- иглы инъекционные ГОСТ 25377-87;
- вода дистиллированная ГОСТ 6709;
- халаты и одноразовые перчатки из латекса;
- комплект средств для обработки рабочего места.

#### 6.6 Реагенты:

- клеточный лизирующий раствор;
- РНК лизирующий буфер;
- РНК промывочный раствор;
- РНК регидрирующий раствор.

#### 6.7 ПЦР-анализ

ПЦР анализ проводят в три этапа в отдельных помещениях (зонах).

##### 6.7.1 Экстракция РНК из исследуемого материала

##### **Выделение РНК из культуры клеток:**

1 Отцентрифугировать 200 мкл культуры клеток в течение 1 минуты при 14000 оборотах в минуту;

2 Надосадок удалить;

4 К осадку добавить 150 мкл РНК лизирующего буфера;

5 Перемешать тщательно, чтобы растворить осадок. Продолжить со второго пункта основного протокола по выделению РНК.

##### **Выделение РНК из ткани:**

1 Добавить 500 мкл клеточного лизирующего буфера к 10–20 мг ткани;

2 Тщательно перемешать;

3 Отцентрифугировать в течение 1 минуты при 14000 оборотах в минуту;

4 Надосадок удалить;

5 Продолжить с первого пункта основного протокола по выделению РНК.

##### **Выделение РНК из крови:**

1 Добавить 500 мкл клеточного лизирующего буфера к 200 мкл крови;

- 2 Инкубировать 5 минут при комнатной температуре;
  - 3 Отцентрифугировать одну минуту при 14000 оборотах в минуту;
  - 4 Надосадок удалить;
- осадоk должен быть полностью белым, иначе повторить пункты 1–4;
- 5 Продолжить выделение с первого пункта протокола по выделению РНК.

**Основной протокол выделения РНК:**

- 1 Добавить 150 мкл BIGTH РНК лизирующего буфера;
- 2 Добавить 40 мкл хлороформа;
- 3 Перемешать дважды по 30 секунд;
- 4 Инкубировать 30 секунд при комнатной температуре;
- 5 Центрифугировать образец при 14000 оборотах 15 минут при комнатной температуре;
- 6 Перенести 60 мкл верхней бесцветной фазы, содержащей РНК в пробирку, содержащую 60 мкл изопропилового спирта;
- 7 Перемешать, переворачивая пробирку;
- 8 Инкубировать 10 минут при минус 20°C;
- 9 Центрифугировать при 14000 оборотах 10 минут при комнатной температуре;
- 10 Осторожно удалить супернатант, оставляя 5 мкл жидкости в микропробирке;
- 11 Добавить 150 мкл BIGTH РНК промывочного раствора и перемешать;
- 12 Инкубировать 1 минуту при комнатной температуре;
- 13 Центрифугировать при 14000 оборотов 5 минут;
- 14 Удалить супернатант;
- 15 Осадоk высушить в течение 5 минут при 37°C;
- 16 Добавить 6 мкл BIGTH РНК раствора для регидратации.

**6.7.2 Обратная транскрипция (зона 2)**

Для этого следует приготовить реакционную смесь для обратной транскрипции (ОТ) как показано в таблице 1. Конечный объем должен быть 10,5 мкл.

Таблица 1 – Приготовление реакционной смеси для ОТ

Компоненты тест-системы	Исследуемый образец
NDV RT-PCR Pre-смесь (VetPCR™)	4,5 мкл
вода, освобожденная от РНКаз и ДНКаз	4 мкл
РНК, выделенная из образца	2 мкл
минеральное масло (при необходимости)	11 мкл

Запустить на амплификаторе программу, указанную в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры обратной транскрипции

1	1 цикл	65°C – 10 мин
2	1 цикл	4°C – 5 мин
Добавить 1 мкл RT-PCR раствора (Brig™)		
Добавить 1 мкл раствора транскриптазы (Biotech™)		
3	1 цикл	25°C – 10 мин
4	1 цикл	37°C – 60 мин
5	1 цикл	70°C – 10 мин

### 6.7.3 Амплификация

Для амплификации следует приготовить реакционную смесь как показано в таблице 3. Конечная концентрация должна быть 13,5 мкл.

Таблица 3 – Приготовление реакционной смеси для амплификации

Компоненты набора	Образец	Положительный контроль	Отрицательный контроль	Внутренний контроль
<i>A. orthoreovirus</i> PCR Prc-смесь (VetPCR™)	5,5 мкл	5,5 мкл	5,5 мкл	
внутренний контроль				5,5 мкл
вода, свободная от РНКаз	6 мкл	6 мкл	6 мкл	6 мкл
кДНК изолированная из образца	2 мкл			2 мкл
<i>A. orthoreovirus</i> положительный контроль		2 мкл		
отрицательный контроль			2 мкл	
минеральное масло (при необходимости)	11 мкл	11 мкл	11 мкл	11 мкл

Запустить на амплификаторе программу (таблица 4). Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1–3 с).

Таблица 4 – Программа для амплификации кДНК вируса реовирусной инфекции птиц

Этап	Температура	Время
1	94 °C	2 мин
2	94 °C	30 с
	58 °C	30 с
	72 °C	30с
	Цикл повторить 30 раз	
3	72 °C	1 мин

После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР (зону 3).

Образцы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 недели при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре не выше минус 16 °C.

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов кДНК в агарозном геле.

6.7.4 Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить 25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия, довести дистиллированной водой до 500 мл, закрыть цилиндр парафильтром и перемешать.

**ВНИМАНИЕ!** Бромид этидия – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Агарозу для электрофореза кДНК из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить 100 мл рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до 65–70°C.

Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. ДНК, соответственно, движется к положительному. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

#### **Порядок работы.**

Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из под слоя масла по 10–15 мкл проб и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В каждом ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен К<sup>+</sup> и, желателно, маркер молекулярных масс кДНК.

Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. Электрофорез проводить при напряжении 100V 30–40 минут.

По завершении времени электрофореза (краситель при этом пройдет примерно половину длины геля – 1,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

#### 6.7.5 Учет и интерпретация результатов.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной части кДНК вируса реовирусной инфекции птиц. Длина амплифицированного специфического фрагмента кДНК вируса реовирусной инфекции птиц должна быть 218 п.н., внутреннего контроля – 140 п.н.

В дорожках, соответствующих отрицательным контролям не должно быть никаких полос, за исключением возможных праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.

#### 6.8 Меры личной профилактики.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для электронных или механических дозаторов с аэрозольным барьером.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду, колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20–24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания биоматериалов (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Проведенный комплекс исследований по изучению культуральных свойств штаммов вируса реовирусного теносиновита птиц на первичных и перевиваемых клетках, развивающихся эмбрионах кур, 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  
реовирусного теносиновита птиц**

Подписано в печать 02.03.2016.  
Формат 60x90 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.  
Гарнитура Times New Roman.  
Усл. печ. л. 1,16. Тираж 60 экз. Заказ № 134.  
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28  
Тел./факс (+375 17) 50 88 131  
E-mail: [bievm@tut.by](mailto:bievm@tut.by)

---

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

