

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРНОГО И
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО НАДЗОРА**

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

УТВЕРЖДАЮ

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

А.М.Субботин

«11» февраля 2016 г.



**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, антигенных,
генетических свойств и инфекционной активности
производственных и эпизоотических штаммов
вируса бешенства**

МИНСК 2016

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

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

Ковалев Н.А. – главный научный сотрудник отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН Беларуси;

Бучукури Д.В. – заведующий опытно-экспериментальным отделом РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

Усеня М.М. – старший научный сотрудник отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

Лысенко А.П. – заведующий отделом молекулярной биологии и РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, профессор;

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

Бешенство было описано древними врачами Востока еще за 3000, Демократом за 500 и Аристотелем более чем за 300 лет до нашей эры.

В 1887 г. Бабеш обнаружил внутри нервных клеток головного мозга больных бешенством животных специфические включения, а Негри (1903) описал их формы, размеры и строение. Эти включения получили название телец Бабеша-Негри.

Фильтруемость вируса бешенства установлена в 1903 г. Ремленже и Рифорат-беем.

Крупным шагом в изучении бешенства являются исследования Луи Пастера. В 1885 г. он впервые применил мальчику И. Мейстеру мозговую вакцину против бешенства. Второй после Франции страной, где были открыты станции по прививке людей против бешенства стала Россия (Одесса, Петербург, Москва, Самара). Новым этапом в развитии специфической профилактики бешенства является производство свободной от мозговой ткани вакцины с использованием культуры клеток.

В начале 80-х годов в США была создана субъединичная вакцина, которая обладает более высокими иммуногенными свойствами, чем из цельного вируса. Получена также высокоэффективная рекомбинантная антирабическая вакцина на основе вируса оспы.

Бешенство регистрируется на всех континентах земного шара (за исключением Антарктиды, Австралии и Новой Зеландии) и установлено у животных, относящихся более чем к 30 видам.

Ежегодно в мире погибает от бешенства свыше 55–60 тыс. человек и более 1 млн. животных. Бешенство широко распространено и в Республике Беларусь. В последние годы ежегодно регистрируется до 0,5–1,5 тыс. случаев заболевания животных. Обращаемость населения за антирабической помощью составляет до 28 тыс. случаев в год. В 200–2006 гг. отмечено 6 случаев гибели от бешенства людей.

Вирус бешенства относится к семейству *Rabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, РНК-содержащий. Большинство частиц вируса (вирионов) имеет форму пули с одним круглым и одним плоским концом. Длина и диаметр вирусных частиц переменны и имеют размеры в среднем 180×75 нм. Поверхность вириона имеет небольшие выступы диаметром 4,5–5,5 нм и длиной 6–7 нм.

По биологическим свойствам вирус бешенства относится к нейротропным вирусам. Вне организма животного вирус не размножается. В организме больного животного вирус накапливается, главным образом, в сером веществе центральной нервной системы, преимущественно в отделах головного мозга.

Вирион вируса бешенства содержит два главных антигена, один из которых представляет собой гликопротеин вирусной оболочки, второй – внутренний нуклеопротеин вириона. Гликопротеин способен индуцировать

образование вируснейтрализующих антител и защищать животных от заражения. Нуклеопротеин индуцирует образование комплементсвязывающих и преципитирующих антител, не обладающих вируснейтрализующей способностью и не оказывающих защиты против бешенства.

Все серотипы вируса бешенства в иммунобиологическом отношении родственны, поэтому любой штамм и его гликопротеин могут быть использованы для вакцинации во всем мире.

Экспериментальная инфекция легко воспроизводится на теплокровных животных всех видов. В лабораторных условиях вирус культивируется путем интрацеребральных пассажей чаще всего на белых мышах и кроликах, а также на культурах клеток фибробластов куриных эмбрионов, почки сайги, *Vero*, ВНК-21 и др. На культурах клеток вирус размножается без цитопатогенного эффекта.

Вирус не устойчив во внешней среде. Лучшими консервантами, при которых вирус сохраняется длительное время (до года и более), является 50%-ный глицерин и низкие температуры (-20°C). При плюс 23°C вирус погибает через 28–53 дня, 50°C – через 1 час, при 70°C – мгновенно. Высушивание убивает вирус через 10–14 дней, гниение через 15 дней. Дезинфицирующие вещества – 1–5%-ный раствор формалина, 5%-ный раствор фенола, 3–5%-ный раствор соляной кислоты инактивируют вирус через 5–10 минут.

В естественных условиях бешенством болеют, главным образом, представители семейства собачьих, летучие мыши и грызуны. Из домашних животных чаще поражаются собаки (до 70%), несколько реже крупный рогатый скот (до 20%), еще реже кошки, лошади, мелкий рогатый скот, свиньи. Заболевание передается путем прямого контакта с больным животным, в основном через укус, однако заражение возможно и при ослюнении пораженной коты. Алиментарный и аэрогенный пути заражения в принципе возможны, но не играют существенной роли.

Наиболее опасны укусы диких плотоядных животных: волков, лисиц и др. Дикие плотоядные, особенно волки, наносят обычно тяжелые укусы, при которых на поверхность ран попадает много вируса.

Вирус выделяется в основном со слюной и может отсутствовать в крови, моче, молоке больного животного.

Спектр патогенности вируса бешенства тесно связан с его экологией. Различают 2 типа эпизоотии бешенства: городской и лесной. Бешенство городского типа наблюдается среди собак и других домашних животных в населенных пунктах. Его распространение в значительной степени зависит от наличия достаточного количества безнадзорных собак. При втором типе возбудитель циркулирует среди диких плотоядных по типу природно-очаговой инфекции. В последние годы бешенство диких плотоядных стало преобладающим. Основным резервуаром и источником инфекции являются рыжие лисицы. Чрезмерному увеличению численности лисиц способствова-

ло истребление их естественных врагов (волков, рысей и др.), увеличение кормовой базы (грызунов) и сокращение объемов охоты на них. Установлено, что средняя плотность популяции лисиц 5 голов и более на 250 га обеспечивает высокий уровень поддержания и распространения эпизоотии. Крупный рогатый скот и другие сельскохозяйственные животные заражаются в основном на пастбищах, входящих в ареалы зараженных лисиц.

Главным в эпизоотическом процессе бешенства является связь возбудителя с резервентами. Цикл круговорота возбудителя можно разделить на 2 периода: межэпизоотический и эпизоотический. Первый период – это период резервации (сохранения) вируса. Он совпадает с уменьшением численности резервентов и снижением контакта больных и восприимчивых животных. Эпизоотический период связан с увеличением численности больных животных. Весенне-летние сезонные подъемы заболеваемости бешенством тесно связаны с биологическими циклами их активности.

По мнению некоторых исследователей при лесном бешенстве значительное количество лисиц переживает инфекцию за счет «нелетального» заболевания. Болезнь у них протекает хронически и латентно, обеспечивая персистенцию вируса. Наоборот, бешенство собак в городских эпизоотиях, как правило, заканчивается их гибелью, поэтому механизм поддержания вируса сводится к коротким циклам репродукции в организме и быстрой передаче восприимчивому организму. Хотя эпизоотии бешенства в настоящее время поддерживаются, главным образом, дикими животными, человеку угрожают прежде всего собаки и кошки вследствие их близкого контакта с последним.

При заражении бешенством восприимчивого организма вирус непродолжительное время находится на месте внедрения, где, по-видимому, не всегда происходит его размножение. Он распространяется центростремительно по нервам. В крови он обнаруживается только в экспериментальных условиях при введении больших доз.

По центростремительным нервным волокнам вирус проникает в спинной мозг, а затем в головной. В центральной нервной системе репликация вируса происходит почти исключительно в нейронах.

Затем вирус из мозга передвигается по центробежным нервным путям в слюнные железы, где и размножается в нервных узлах. После дегенерации нервных клеток вирус выходит в проток слюнных желез и на поверхность слизистой оболочки рта, инфицируя слюну. Он транспортируется также в ретину и роговую оболочку глаз, парафолликулярные нервные окончания, в кожу, легкие, почки, надпочечники, скелетные мышцы, поджелудочную железу, молочные железы и выделяется с молоком.

Симптомы заболевания бешенством появляются лишь после распространения вируса по всему организму.

Инкубационный период при бешенстве продолжается от 2–3 недель до нескольких месяцев. У собак бешенство проявляется в двух формах – буйной, которая встречается наиболее часто, и тихой. Первым признаком

заболевания является изменение поведения животного. Собака становится скучной, раздражительной, прячется в темные места или же, наоборот, проявляет неестественную веселость и оживление. Иногда начинает с ожесточением лизать и даже разгрызать место бывшего укуса. Заболевшая собака отказывается от обычной пищи, но поедает разные несъедобные предметы (щепки, бумагу, солому и др.). Кроме того, наблюдаются затруднение дыхания, расширение зрачков, судороги мускулатуры глотки и гортани. Глощает животное с трудом, вытягивая шею, лай становится хриплым. В результате расстройства акта глотания отмечается обильное слюнотечение.

При буйной форме бешенства в дальнейшем нарастают признаки возбуждения. Собака с неистовством грызет цепь, пол, стены, прутья, норовит сорваться с привязи и убежать. Если собаке удастся освободиться, она убегает и во время бродяжничества набрасывается на других собак, животных, человека. При этом кусает молча, без лая и урчания.

Период возбуждения сменяется стадией параличей. Наряду с параличом нижней челюсти, глазных мышц и языка развиваются параличи задних конечностей и хвоста. Постепенно параличи распространяются на передние конечности и туловище. При полном истощении и упадке сил собака погибает. Общая продолжительность заболевания – 8–11 дней.

При тихой, или паралитической, форме бешенства уже в начале болезни у собаки развиваются параличи нижней челюсти, глотки, задних конечностей. Собака не может глотать, и создается впечатление, что она подавилась. Течение болезни быстрое. Смерть обычно наступает через 3–4 суток.

В отдельных случаях бешенство у собак может протекать при явлениях острого воспаления желудочно-кишечного тракта (желудочно-кишечная форма).

Бешенство диких плотоядных животных протекает почти так же, как и у собак. Волки и лисицы становятся агрессивными, безбоязненными. Даже в дневное время забегают в населенные пункты, набрасываются на людей и животных, нанося им укус. В конце болезни у них развиваются параличи нижней челюсти и задних конечностей.

Бешенство кошек протекает в основном в буйной форме. Кошки прячутся в темное место, постоянно мяукают, очень злы, бросаются на людей и животных, норовя искушать и исцарапать. Аппетит у них извращается, они поедают несъедобные предметы. С развитием болезни наблюдается слюнотечение, появляются параличи глотки, гортани, нижней челюсти, голос становится слабым и хриплым. В дальнейшем развиваются парезы и параличи задних, а также передних конечностей, водобоязнь. Длительность болезни – от 2 до 5 дней.

У сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, лошади, свиньи, овцы и козы) бешенство также чаще протекает в буйной форме и характеризуется возбуждением, извращением аппетита, расширением зрач-

ков, обильным слюнотечением. Агрессивность по отношению к человеку и животным наблюдается редко. К концу болезни развиваются параличи – сначала гортани и глотки, затем задних и передних конечностей. Смерть наступает на 3–6-й день.

При тихой форме бешенства симптомы возбуждения выражены в незначительной степени, но очень рано развиваются параличи.

Специфические методы лечения при бешенстве отсутствуют, поэтому одной из основных мер борьбы с бешенством была и остается антирабическая вакцинация. Вакцинопрофилактика бешенства имеет вековую историю. Созданная впервые Л. Пастером мозговая вакцина в свое время сыграла большую роль в борьбе с бешенством. Однако она имела ряд существенных недостатков, главные из которых: наличие в препарате большого количества мозговой «балластной» ткани и жизнеспособного вируса – источников поствакцинальных осложнений, а также необходимость многократных инокуляций вакцины, что побуждало исследователей на поиски новых путей совершенствования препарата. За прошедшие годы появилось много различных модификаций антирабических вакцин, авторы которых стремились повысить их иммуногенные свойства с одной стороны путем отбора новых вакцинных штаммов и повышения стабильности вакцины при хранении, с другой – путем изыскания иных систем (кроме мозга) культивирования вируса бешенства, а также способов очистки вируса от сопутствующих балластных веществ и инактивации инфекционности, входящего в состав вакцин вируса.

Для изготовления вакцин ВОЗ рекомендует следующие штаммы вируса бешенства: Парижский штамм Пастера, PV-11 или PM, *CVS*, *Flury Lep*, *Flury Hep*, *Kelev*, *EPA* и Внуково-32.

Парижский штамм Пастера – первый вакцинный штамм вируса бешенства. Он выделен в 1882 г. из мозга погибшей от бешенства коровы. В результате 50-ти мозговых пассажей на кроликах вирус приобрел свойства фиксированного. Внутримозговой 90-й пассаж на кроликах был использован Пастером для изготовления первой антирабической вакцины. В дальнейшем Парижский штамм разошелся по всему миру и используется (под разными названиями) до настоящего времени для изготовления антирабических вакцин. В России (прошедший 34500 внутримозговых пассажей на кроликах) он используется под названием штамм «Москва», штамм «Овечий». Штамм PV-11 или PM, является производным пастеровского штамма фиксированного бешенства. Штамм *CVS* (*Challenge virus standart*) представляет собой стандартный штамм, используемый при оценке иммуногенности выпускаемых антирабических вакцин. По происхождению он является производным пастеровского штамма фиксированного вируса бешенства. Штамм *Flury Lep* выделен в США из мозга погибшей девочки по имени Флюри, прошел 130 пассажей через мозг однодневных цыплят и 40–50 пассажей в развивающихся куриных эмбрионах. На этом уровне пасса-

жей он апатогенен для собак и кроликов при подкожном введении, слабо патогенен для мышей, морских свинок и сирийских хомяков при подкожном и внутримышечном введении. Штамм высокопатогенен для всех лабораторных животных при внутримозговом заражении. Штамм *Flury Hep* – это штамм *Flury Lep* прошедший 180 пассажей на куриных эмбрионах. На этом уровне пассажей он утратил патогенность для мышей при внутримозговом заражении, но сохранил ее для мышей-сосунов 3–8-дневного возраста. При внутримышечном и подкожном введении апатогенен для всех лабораторных животных, в том числе и для щенят до 3-х месячного возраста. Штамм *Kelev* выделен из мозга бешеной сабаки. После 4 пассажей через мозг мыши прошел более 100 пассажей на куриных эмбрионах. На уровне 70-го пассажа штамм почти полностью утратил патогенность для взрослых кроликов, мышей, хомяков и собак при введении внутримышечно или в мозг, сохранив при этом патогенность для мышей 10–14-дневного возраста. Штамм ЕРА является вариантом штамма SAD (Street Alabama Dufferin), который был выделен от бешеной собаки в штате Алабама (США). Штамм прошел 130 пассажей через мозг мышей, затем был адаптирован к культуре клеток почки сирийского хомяка. После 30-ти пассажей в этой системе прошел 8 пассажей на куриных эмбрионах и затем адаптирован к культуре клеток почки поросенка. Вирус 35-го пассажа в культуре клеток почки поросенка получил название ЕРА. Штамм Внуково-32 представляет собой вариант штамма SAD, прошедший 90–100 пассажей при температуре 32°C в культуре клеток почки сирийского хомяка.

Кроме перечисленный для изготовления антирабических вакцин для животных используются и другие штаммы вируса: (SAD, SAG 1 и 2 и др.), которые являются дериватами штамма SAD. В странах СНГ для этих целей используют штаммы Щелково-51, ТС-80, 71БелНИИЭВ-ВГНКИ.

В ветеринарной практике в настоящее время применяются как живые тканевые и культуральные, так и инактивированные антирабические вакцины. В 90-х годах 20-го ст. для животных изготовлялось 84 разновидности антирабических вакцин в 41 стране мира. Из них 30 типов вакцин – живые аттенуированные, остальные 54 – это вакцины содержащие в своем составе инактивированный разными способами вирус.

Живые аттенуированные вакцины готовят, как правило, на основе культур клеток (почка сирийского хомяка, ВНК-21, почки поросенка и др.) или развивающихся куриных эмбрионов.

В России, как и во многих других странах парентеральное применение живых антирабических вакцин в настоящее время запрещено.

В настоящих методических указаниях приведены требования и описаны методы изучения культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных и эпизоотических штаммов вируса бешенства.

1 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ И КОНТРОЛЬНЫМ ШТАММАМ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ, ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК, ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН

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

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

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

1.5 Для изготовления живых вакцин против бешенства 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* в условиях, обеспечивающих его чистоту в отношении контаминантов генетическую стабильность в отношении иммуногенных, антигенных и других биологических свойств на протяжении не менее, чем 10 прямых пассажей.

1.10 Необходимые требования к вирусу бешенства:

Таблица 1 – Требования к вирусу бешенства

№ п/п	Показатели	Ед. измер.	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса в суспензии клеток ВНК-21/13	часы	72–96
2	оптимальная доза заражения	ЭД ₅₀ /мл	0,2–1,0
3	объемная доза заражения	мл/л вир. сусп	1:30–1:100
4	оптимальное значение pH при репродукции	ед. pH	7,2–7,6
5	оптимальная температура размножения	град. С	36–37,5
6	титр инфекционности после репродукции в суспензии клеток ВНК-21/13 с концентрацией 1,3-2,2 млн/мл	Lg ЭД ₅₀ /мл	6,5 и выше
7	стерильность	кол-во колоний в мл.	не допускается
8	типоспецифичность	типсовая принадлежность	типоспецифичен

2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования вируса бешенства:

Клетки предназначены для культивирования вируса бешенства с целью изучения морфологических свойств вируса и 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 хранится 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 и до 6,8–7,3.

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

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов вируса бешенства

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 DMEM, («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520) или других изготовителей);

- среда 199 производства фирмы «Sigma» (номер продукта M0393) или других изготовителей;

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

- культура клеток *Vero*, ВНК 21/13;

- антибиотики (гентамицин с массовой долей 4%, пенициллин, стрептомицин, тетраамицин и др. по ТНПА изготовителя).

2.3 Выращивание клеток в монослое.

2.3.1 Реконсервирование клеток.

Для культивирования используют клетки *Vero*, ВНК 21/13, 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 с концентрацией 150–200 тыс/мл жизнеспособных клеток высевают в матрасы или роллерные сосуды.

Клетки выращивают 48–72 ч при температуре 37° С, через 24ч проводят смену питательной среды. Сформировавшийся монослой для проведения последующих пассажей снимают безцентрифужным способом. Из матрасов или роллерных сосудов удаляют ростовую среду, пласт клеток дважды ополаскивают смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1:9. Культуру укладывают пластом вверх, в таком положении она находится 10–15 мин. 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, добавляют питательную среду. Суспензию клеток с одного матраса делят на два, т. е. пересев проводят с коэффициентом 1:2.

На следующих пассажах пересев осуществляют с коэффициентом 1:3, 1:4. Таким образом проводят 3–5 пассажей, в течение которых клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства. Клетки *Vero* или ВНК-21/13 в 3–5 пассаже передают на заражение вирусом. Клетки ВНК-21/13 на последнем пассаже снимают с монослоя методом, описанным выше, ресуспендируют в питательной среде для суспензионного выращивания и передают для культивирования в суспензии.

2.3.4 Криоконсервирование клеток.

Для успешного криоконсервирования клеток *Vero*, ВНК 21/13, выращенных в монослое, необходимо брать их в конечной стадии логарифмического роста. С монослоя клетки снимаются трипсин-версеном. Полученная суспензия должна иметь жизнеспособность не менее 95–100%. Для концентрирования и частичного освобождения суспензии от отработанной среды, ее центрифугируют при 1000 об/мин. К клеточному осадку добавляют све-

жей ростовой среды и доводят до нужной концентрации (20–35 млн. клеток в мл). В концентрат клеток добавляют 5–7% полиэтиленгликоля ММ 6000 и сразу расфасовывают в ампулы, которые запаивают на кислородной горелке или полистироловые флаконы. Ампулы и флаконы маркируют и помещают в контейнеры. Экспозиция с криопротектором до начала замораживания не должна превышать двух часов.

Подготовленные контейнеры с ампулами размещают в камеру замораживания программного устройства или лабораторной установки и после этого начинают двухэтапное понижение температуры: на первом этапе до -30°C (1–2°С 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 бешенства к культивированию.

Посевной вирус предназначен для заражения клеток *Vero* или ВНК 21/13, выращенных в монослое или суспензии. Этот вирус готовят из мозгового материала или музейных расплодов производственных штаммов в монослойной перевиваемой линии клеток *Vero* или ВНК-21/13, выраженных в матрасах (1,0–1,5 л) или во вращающихся бутылках емкостью 1–3 л.

Мозговой вирус любого типа адаптируют к монослойной культуре клеток *Vero* или ВНК-21/2-17 в течение 4–5 пассажем.

Исходным материалом для заражения монослойных культур служит 10% суспензия из мозга мелкого рогатого скота, приготовленная традиционным способом на питательной среде (ФГМС., ГБКС на растворе Эрла без сыворотки) с рН 7,4–7,8; при этом в питательную среду вносят антибиотики: пенициллин, стрептомицин и левомецетин по 400, 400 и 200 Ед соответственно. Экстракцию проводят в течение 60 мин при комнатной температуре или 13 ч при температуре 4°C . Центрифугирование проводят при 2000 об/мин в течение 20 мин. Надосадок декантируют, необходимое количество разводят питательной средой (рН 7,4–7,6) 1:5–1:10 и по 5–10 мл, в зависимости от объема флакона, инокулируют в матрасы с культурой клеток, которые предварительно дважды отмывают той же средой от остатков ростовой среды. Затем в течение 60 мин осуществляют адсорбцию вируса на клетках при температуре 37°C . После указанной экспозиции инокулянт сливают, а монослой трижды отмывают питательной средой с рН 7,4–7,6. Затем в матрасы вносят по 100–150 мл среды с антибиотиками: пенициллином, стрептомицином и левомецетином по 200 Ед каждого.

Инкубацию зараженных клеточных культур проводят при температуре 37°C до специфического поражения монослоя (ЦПД) на 75–90% (18–30 ч). После замораживания и оттаивания культуральную вирусосодержащую жидкость сливают в одну емкость, корректируют рН до 7,4–7,6 и рас-

фасовывают в пенициллиновые флаконы по 10 мл, маркируют (этикетировывают) и хранят при температуре -40°C .

При освежении лиофилизированного вирусного материала его разводят на питательной среде с рН 7,5–7,6 и инокулируют в матрасы с монослойной культурой клеток *Vero* или ВНК-21/13. Обращение с культурами клеток и вирусом аналогично описанному выше.

Для проведения второго пассажа оттаивают необходимое количество вируса, в пенициллиновых флаконах и после теплообработки в водяной бане при 58°C в течение 15 мин заражают монослойные культуры клеток *Vero* или ВНК-21/13 по 10 мл на матрас. Клеточные культуры предварительно отмывают от ростовой среды. Адсорбцию проводят в течение 60 мин, после чего монослой клеток отмывают 2–3 раза и заливают питательной средой по 100–150 мл с рН 7,5–7,6. Инкубируют при температуре 37°C до появления ЦПД на 75–90%. После замораживания-оттаивания и корректировки рН вирусосодержащую жидкость второго 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 бешенства отсутствуют.

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

3.1 Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов вируса бешенства определяют методом титрования в одной из культур клеток *Vero*, ВНК 21/13.

3.2 Последовательные десятикратные разведения вируса бешенства 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} . Жидкость в первой лунке тщательно пипетируют дозатором и переносят $0,1\text{ см}^3$ во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса 10^{-8} включительно.

Берут культуральный планшет с выращенным монослоем культуры клеток ВНК 21/13 и удаляют из него ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку, переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем по $0,1\text{ см}^3$ каждого разведения вируса 10^{-1} , затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по $0,1\text{ см}^3$ разведения вируса 10^{-2} и так далее до разведения 10^{-8} включительно.

3.3 Культивируют клетки 48 часов в CO_2 -инкубаторе при температуре 37°C и 5 % CO_2 , затем фиксируют монослой клеточной линии охлажденным при температуре -20°C ацетоном. Так как штаммы вируса бешенства не оказывают на клеточные линии цитопатогенного действия, то для определения

инфекционной активности вирусной суспензии использовали метод непрямой флуоресценции. Для этого применяют специфические моноклональные антитела к вирусу бешенства, меченные изотиоцианитом флуоресцина (FITC) (Fujirebio, U.S.A.), которыми производят окрашивание клеточного монослоя. Учёт результатов производят с помощью микроскопа (МИКМЕД-6, ЛОМО, Россия или других с аналогичными характеристиками) (увеличение 100х) с люминисцентной насадкой. При микроскопировании учитывают яркое специфическое свечение зелёного цвета, которое свидетельствует о наличии вируса бешенства в клетках, и лунки с таким свечением отмечают как положительные (рисунок 1).

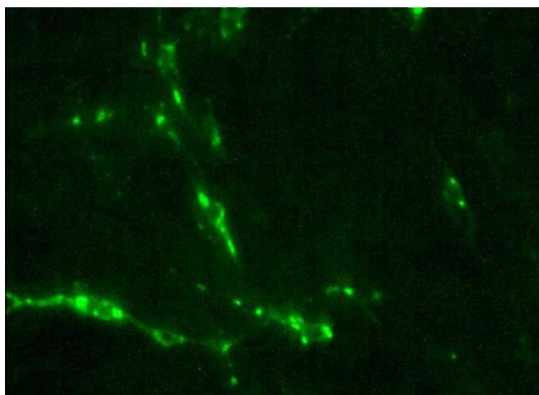


Рисунок 1 – Клетки линии ВНК-21 / С13, инфицированные вирусом бешенства. Окраска FITC-меченными моноклональными антителами, увеличение 100^x

Расчёт титра вируса проводили с помощью формулы Спирмена-Карбера и выражали в десятичном логарифме 50 %-ой фокусформирующей инфицирующей дозы (lg FFD50):

$$\lg \text{FFD50} = (x_0 \% d/2 + d \sum r_i/n_i), \text{ где}$$

x_0 – lg наибольшего разведения, в котором во всех лунках отмечается положительное свечение;

d – lg фактора разведения;

n_i – общее количество лунок, приходящихся на каждое разведение титрации вирусной суспензии;

r_i – количество положительных лунок в каждом разведении титрации вирусной суспензии.

В качестве контроля служат:

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

Культуру клеток в планшетах инкубируют в CO₂-инкубаторе при 5%

CO₂ и температуре (37,0±1,0)°C.

Для определения специфической инфекционной активности вирусной суспензии используют метод титрации вируса в культуре клеток линии ВНК-21/13.

Инфекционная активность производственных вируса бешенства должна быть не ниже, чем 8,0 lg ТЦД 50/мл.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

4.1 Материалы и реактивы:

- колбы мерные вместимостью 25,0; 100,0 см³; по ГОСТ 1770;
- пипетки 1,0; 5,0; 10,0 см³ по ГОСТ 29227;
- пробирки П1-16-150ХС по ГОСТ 25336;
- стерилизатор по ГОСТ 23932;
- шприцы стеклянные медицинские многократного применения по ГОСТ 22967;
- иглы инъекционные многократного применения по ГОСТ 25377;
- питательная среда Игла МЕМ или ДМЕМ по ФСП 42-0070-4037 или фирмы «Sigma» (США);
- клинически здоровые белые мыши массой 6–8 г – 32–40 голов.

4.2 Проведение испытания.

Объединенную пробу вируса бешенства, получают из двух-трех флаконов, содержащих культуральный вирус, смешивая их в одном флаконе в объеме 5,0 мл.

Из объединенной пробы культурального вируса бешенства готовят десятикратные разведения от 10⁻¹ до 10⁻⁸. Для этого в ряд из семи пробирок наливают по 9,0 см³ питательной среды Игла МЕМ или Игла ДМЕМ. В первую пробирку вносят 1,0 см³ объединенной пробы вируса бешенства. В последующем каждое разведение делается отдельно взятой чистой стерильной пипеткой: содержимое первой пробирки в объеме 1,0 см³ переносят во вторую пробирку и тщательно перемешивают, и т.д. до конечного разведения 10⁻⁸. Каждым разведением вируса бешенства, начиная с разведения 10⁻⁸, в объеме 0,03 см³ заражают интрацеребрально (в мозг) не менее четырех клинически здоровых белых мышей (опытная группа). Контрольной группе клинически здоровых белых мышей (четыре головы) интрацеребрально вводят 0,03 см³ питательной среды, которую использовали для приготовления разных разведений объединенной пробы вакцины. Срок наблюдения за животными – 14 суток. Специфической считается гибель мышей опытной группы не ранее, чем на пятые сутки после заражения при наличии типичных признаков заболевания (параличи, парезы, коматозное состояние, взъерошенность шерсти и др.). Животные контрольной группы не должны

заболевать и гибнуть. Расчет титра вируса производят по методу Рида и Менча или по Керберу в модификации Ашмарина.

4.3 Обработка результатов.

Культуральный вирус бешенства считается активной, если титр вируса в ней составляет не менее $6,0 \text{ 1g MICLD}_{50}/\text{cm}^3$.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИДЕНТИЧНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА

5.1 Метод иммунофлуоресценции

Сущность метода заключается в соединении меченых антител со специфическим антигеном и наблюдении светящихся комплексов «антитело-антиген» в полях зрения люминесцентного микроскопа.

5.1.1 Аппаратура, материалы, реактивы и растворы:

- микроскоп люминесцентный;
- термостат с температурой нагрева 37°C ;
- холодильник;
- стекла предметные по ГОСТ 9284;
- пробирки бактериологические по ГОСТ 25336–82;
- чашки Петри по ГОСТ 25336–82;
- пипетки мерные по ГОСТ 20292–74.1;
- набор инструментов для вскрытия черепной полости и извлечения головного мозга животных;
- пинцеты по ГОСТ 21241–77;
- горелка газовая или спиртовая;
- ацетон по ГОСТ 2603–79;
- диагностический иммуноглобулин флуоресцирующий антирабический;
- лабораторные животные;
- масло нефлуоресцирующее иммерсионное по ГОСТ 13739-78.
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709–72;
- раствор фосфатный буферный, pH 7,4.

5.1.2 Подготовка к исследованию.

Для исследования используют головной мозг, полученный после宰ражения мышей, описанному в разделе 4.

Из каждого отдела головного мозга (аммонова рога, мозжечка, коры больших полушарий и продолговатого мозга) готовят по два препарата – мазка-отпечатка.

Препараты высушивают на воздухе и фиксируют в охлажденном ацетоне при температуре плюс 4 или минус $18\text{--}20^{\circ}\text{C}$ в течение 4–12 ч. Затем препараты извлекают из ацетона, высушивают на воздухе 10–15 мин и помещают их во влажную камеру (чашки Петри с увлажненным дном).

Диагностический антирабический флуоресцирующий иммуно-глобулин в рабочем разведении наносят равномерно на всю поверхность препарата при помощи пипетки (примерно 0,1 см³ на один препарат) закрывают камеру с препаратами, помешают в термостат и выдерживают 30 мин при температуре 37°C. Затем предметные стекла с препаратом троекратно промывают, погружая их каждый раз на 10 мин в сосуд, наполненный фосфатным буфером pH 7,4, промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

На окрашенные препараты наносят иммерсионное нефлуоресцирующее масло.

Проведение исследования

Подготовленные препараты просматривают под люминесцентным микроскопом с иммерсионной системой.

Обработка результатов

При положительных результатах исследования в препаратах, содержащих антиген культурального вируса бешенства, обнаруживают разной величины и формы ярко светящиеся желто-зеленым цветом гранулы в нейронах и вне клеток. Размер их колеблется от едва заметных в виде песчинок образований до 15–20 микрон.

Не пораженная вирусом бешенства мозговая нервная ткань светится тусклым серовато-желтым или зеленоватым цветом.

5.2 Метод биологической пробы

Сущность метода заключается в выделении вируса от больных убитых или павших животных путем инокулирования патологического материала или вирусосодержащей жидкости с культуральным вирусом бешенства белым мышам и последующей его идентификации.

Биопробу проводят, если выявление рабического антигена методом иммунофлуоресценции в первичном материале окажется отрицательным.

5.2.1 Аппаратура, материалы, растворы:

- центрифуга с частотой вращения ротора 2000 об/мин. Пробирки центрифужные;
- ступки;
- шприцы с иглами. Посуда для содержания мышей. Антибиотики (стрептомицин, пенициллин);
- раствор нейтральный физиологический.

5.2.2 Подготовка к исследованию

Материал для заражения мышей готовят из равных частей нервной ткани аммонова рога, мозжечка, коры полушарий, продолговатого мозга или из ВСЖ.

Ткань измельчают ножницами и растирают в ступке (или гомогенизаторе), постепенно прибавляя нейтральный физиологический раствор до получения 10%-ной суспензии.

Суспензию центрифугируют с частотой вращения ротора 2000 об/мин в течение 5–10 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильную про-

бирку и хранят в холодильнике при температуре 0–4°C до ее использования не более 2 часов. При подозрении на бактериальную нестерильность в суспензию добавляют 500 МЕ пеницилин и 500 МЕ стрептомицина на 1 см³ суспензии и затем выдерживают ее при комнатной температуре 30 мин.

5.2.3 Проведение исследования

Для биопробы берут белых лабораторных мышей массой 8,0–10,0 г или сосунков в возрасте 20–25 сут. массой 6,0–8,0 г.

Мышей заражают подготовленной суспензией или ВСЖ культурального вируса бешенства интрацеребрально в дозе 0,03 см³.

На одну биопробу заражают 6–10 мышей.

Зараженных мышей помещают в клетки или банки, на которые наклеивают этикетку с указанием даты заражения, количества мышей, способа заражения и номера экспертизы. Горловину банки накрывают сеткой, препятствующей проникновению насекомых.

Зараженных мышей осматривают ежедневно в течение 14 суток. Количество здоровых, больных и погибших мышей регистрируют в журнале.

5.2.4 Обработка результатов

При оценке результатов учитывают проявление клинических признаков у зараженных мышей:

- взъерошенность шерсти, тремор;
- нарушение координации движения;
- параличи;
- протрация.

Гибель зараженных мышей в срок до 96 ч не учитывают в оценке результатов. От мышей, павших после указанного срока, головной мозг исследуют, как указано выше.

Биологическую пробу на бешенство считают положительной, если в препаратах из мозга зараженных мышей обнаруживают антиген методами иммунофлуоресценции.

Отрицательный диагноз на бешенство может быть дан только по истечении 14-суточной постановки биопробы при отсутствии специфической гибели мышей.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ПЛОТОЯДНЫХ

6.1 Генетическая идентичность и принадлежность штаммов вируса бешенства плотоядных 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 бешенства плотоядных с помощью тест-системы БелНИИЭВ используют следующие реактивы и 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;
- набор реактивов для выделения общей РНК из образцов тканей и клеток с использованием неорганического сорбента («РНК – ВТК» ТУ ВУ 100185129.076);
- буфер для обратной транскрипции«Fermentas» (Литва, кат. номер EP0441);
- рибонуклеазный ингибитор (RiboLock) («Fermentas», Литва, кат. номер EO0381);
- обратная транскриптаза (RevertAid M-MuLV) («Fermentas», Литва, кат. номер EP0441);
- буфер для ПЦР (Buffer “AM” 10X) (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер R1 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер F1 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер F2 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- смесь дезоксинуклеотидов«Fermentas», Литва, кат. номер R0192;

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

6.3 Материал для исследования.

Метод рассчитан на выявление РНК в штаммах вируса бешенства плотоядных и в пробах биологического материала.

6.4 ПЦР-анализ.

6.4.1 Подготовка исследуемой пробы материала.

Штаммы вируса бешенства в предварительной пробоподготовке не нуждаются. В качестве патматериала используют слюну животного и продолговатый мозг.

Материал доставляют в лабораторию, не позднее, чем через три дня с момента забора материала, сохраняя при температуре от плюс 2°C до 8°C. Для исследования достаточно 0,20 мл жидкости биоматериала.

При исследовании продолговатого мозга, его измельчают ножницами и растирают в физиологическом растворе. Для исследования достаточно 0,2 мл суспензии биоматериала.

6.4.2 Типирование штаммов вируса бешенства плотоядных

Используют праймеры синтезированные к области высококонсервативного гена N (нуклеопротеин). Локализация нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеопротеин в геноме вируса бешенства плотоядных, соответствует позиции с 59 по 356 нуклеотид. Данные представлены по последовательности полного гена штамма вируса бешенства «EF_206720» – 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 желательно проводить

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

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

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

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

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

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°C в течение двух мин, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин.

После из пробирок отобрать пипеткой полуавтоматической по 0,30 мл надосадочной жидкости, смешать с равным количеством спирта этилового с объемной долей 96% (раствора 3), перемешать, и нанести смесь на колонку, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин. Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической с отдельным наконечником с аэрозольным барьером, добавить 0,25 мл промывочного раствора 1 и центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин. Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической с отдельным наконечником с аэрозольным барьером, добавить 0,40 мл промывочного раствора 2 и центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин. Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической с отдельным наконечником с аэрозольным барьером, добавить 0,25 мл промывочного раствора 2 и центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин.

Колонки перенести в новые маркированные пробирки, добавить по 0,05 мл элюирующего раствора, инкубировать в твердотельном термостате

в течение трех мин, при температуре плюс 45°C, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение двух мин. Полученный раствор, содержащий тотальную РНК, использовать во втором этапе (зона 2).

6.4.3.2 Этап 2 (зона 2).

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

Рассчитать необходимое количество реакционной смеси с учетом расхода на одну пробу. Отобрать необходимое количество микропробирок. Приготовить (на льду) необходимое количество реакционной смеси. Для проведения нескольких (N) реакций приготовить ОТ-смесь содержащую в 20 мкл реакционной смеси: 2,7 мкл буфера для ревертазы, 1,6 мкл 10 mM dNTP mix, 0,35 мкл обратного праймера с концентрацией 28–35 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 0,5 мкл каждого праймера (2-х прямых и одного обратного) с концентрацией 28–35 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} 94°C – 3 мин; (T_{ден} 94°C – 0,5 мин, T_{отж} 57°C – 0,5 мин, T_{элон} 72°C – 0,5 мин) – 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, за-

лить 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. Пластину с агарозным гелем поместить в электрофоретическую камеру, расположив лунками к отрицательному электроду. В камеру залить готовый электрофорезный буфер из расчета, чтобы он покрывал гель приблизительно на 1 мм сверху.

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

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

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

6.4.3.4 Учет результатов.

Проба с ПКО должна быть видна в ультрафиолетовом свете при длине волны равной 254 нм или 310 нм в виде светящихся полос красно-оранжевого цвета на уровне 292 bp (рисунок 2, проба 2, 3), а с ОКО – должна отсутствовать светящаяся полоса (рисунок 2, проба 1). Положительным результатом исследуемого образца на геле считается полоса кДНК, наблюдаемая на уровне видимой полосы ПКО (рисунка 2, проба 2, 3), при отсутствии таковой в ОКО (рисунок 2, проба 1) – дорожка на геле пустая. Длина амплифицированных специфических фрагментов 292 (проба 2, 3) нуклеотидных пар.

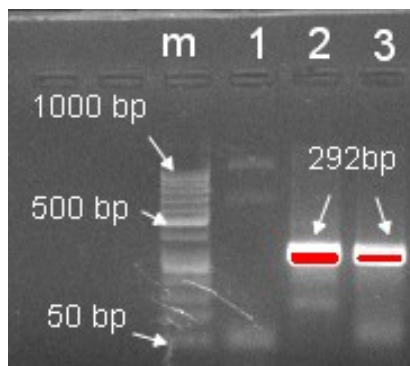


Рисунок 2 – Интерпретация результатов электрофореза (1 – проба ОКО; 2,3 – ПКО (штамм вируса бешенства плотоядных); m – маркер

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 бешенства на перевиваемых клетках, определению его инфекционной активности, видовой принадлежности, специфичности и генетической идентичности позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать штаммы вируса и использовать их биотехнологическом производстве биопрепаратов и диагностических тест-систем.

Нормативное производственно-практическое издание

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, антигенных,
генетических свойств и инфекционной активности
производственных и эпизоотических штаммов
вируса бешенства

Подписано в печать 02.03.2016.
Формат 60x90^{1/16}. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ № 135
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»