

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРНОГО И
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО НАДЗОРА**

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

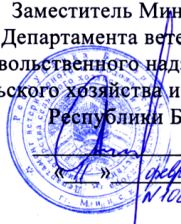
УТВЕРЖДАЮ

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

А.М.Субботин

« 11 » *сентября* 2016 г.

N 1023/8



**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, инфекционных,
антигенных и генетических свойств
производственных и эпизоотических штаммов
вируса инфекционного ларинготрахеита птиц**

МИНСК 2016

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

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

Кныш Н.В. – старший научный сотрудник отдела болезней птиц, пчел 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;

Гуринович О.Л. – младший научный сотрудник отдела болезней птиц, пчел и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;

Волчек Л.Т. – младший научный сотрудник отдела болезней птиц, пчел и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

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

В настоящее время концентрация значительного количества птицы на ограниченной территории закономерно привела к увеличению риска возникновения опасных инфекционных болезней, среди которых одним из ведущих заболеваний является инфекционный ларинготрахеит птиц.

Инфекционный ларинготрахеит птиц (ИЛТ) – контагиозная вирусная болезнь кур, индеек, цесарок, фазанов, куропаток, домашних и диких голубей, уток и гусей, характеризующаяся поражением слизистых оболочек верхних дыхательных путей и глаз.

Возбудитель ИЛТ птиц – это ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Alphaherpesviridae*, роду *Herpesvirus*. С 2012 г., по данным International Committee on Taxonomy of *Viruses*, возбудитель ИЛТ отнесен к роду *Iltovirus*.

В естественных условиях к ИЛТ восприимчивы куры всех возрастных групп. Наиболее часто заболевают куры в возрасте 40–90 дней, но не исключено появление болезни и у 25–30-дневных цыплят. Вспышки ИЛТ встречаются во все времена года, однако наибольшее распространение он имеет в зимние месяцы. К вирусу ИЛТ восприимчивы индейки, фазаны, павлины и перепела. Искусственно удавалось заражать голубей, японских перепелов, уток и гусей. Кролики, морские свинки и белые крысы – резистентные к заражению вирусом ИЛТ.

Источником возбудителя ИЛТ является больная и переболевшая птица, а также птица с бессимптомным течением ИЛТ. После переболевания ИЛТ у птиц наблюдается длительное вирусоносительство – до 2 лет и более. Вирус от больных птиц можно выделить уже на 7 день после появления симптомов болезни, после чего переболевшие птицы остаются вирусоносителями и периодически выделяют вирус. Основной путь передачи инфекции – аэрогенный (воздушно-капельный и воздушно-пылевой). Заражение может происходить трансовариально.

Инкубационный период при ИЛТ составляет в среднем 4–10 дней (с колебаниями от 2 до 30 дней). Его продолжительность зависит от вирулентности, количества вируса, попавшего в организм птицы, способа заражения, а также устойчивости птицы к заболеванию.

ИЛТ по локализации поражений может протекать в ларинготрахеальной и конъюнктивальной формах.

Специфическая профилактика ИЛТ основывается главным образом на применении живых вакцин. Атенуация вируса достигается его пассированием в куриных эмбрионах (КЭ) или культуре клеток (КК) почки КЭ. Все вакцинные штаммы, применяемые для конструирования вакцин против ИЛТ, обладают выраженной иммуногенностью, вызывают реакцию у привитых птиц и передаются горизонтально.

При этом, для конструирования вакцин и диагностических тест-систем требуются аттестованные и депонированные производственные или эпизоотические штаммы вируса инфекционного ларинготрахеита птиц.

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

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

1.1 Контрольные штаммы инфекционного ларинготрахеита птиц 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 должен культивироваться *in vitro* или в организме естественно восприимчивого животного, сохраняя фиксированные показатели вирулентных свойств в течение не менее 10 пассажей. Вирус культивируется на SPF-эмбрионах путем проведения последовательных пассажей.

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 инфекционного ларинготрахеита птиц используют штаммы вирусов, обладающие пониженной вирулентностью, умеренной реактогенностью, безвредностью и иммуногенностью для естественно восприимчивой птицы всех возрастов, не способные к реверсии в вирулентное состояние.

1.6 Штамм не должен представлять опасность заражения птиц 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 Штамм должен быть устойчив к реверсии в сторону вирулентности у естественно восприимчивой птицы на протяжении 10 последовательных пассажей испытуемого штамма вируса на этой птице.

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 инфекционного ларинготрахеита птиц.

Таблица 1 – Требования к вирусу инфекционного ларинготрахеита птиц

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
11	оптимальный возраст для заражения SPF-эмбрионов вирусом ИЛТ	дни	9–11
22	время репродукции вируса в SPF-эмбрионах	часы	96–120
33	оптимальная доза заражения	ЭИД ₅₀ /см ³	10 ²
44	оптимальный объем инокулята для заражения	см ³	0,2–0,3
55	титр инфекционности после репродукции в SPF-эмбрионах	lg ЭИД ₅₀ /см ³	5,5 и выше
66	стерильность	кол-во колоний в мл.	не допускается
77	типоспецифичность	типовая принадлежность	типоспецифичен
88	генетические свойства	генетическая принадлежность	должен соответствовать по генетическим свойствам положительному контролю

2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ НА SPF-ЭМБРИОНАХ

2.1 Общие требования к SPF-яйцам, используемым для культивирования вируса инфекционного ларинготрахеита птиц.

Яйца куриных эмбрионов, необходимых для пассажей вируса ИЛТ и приготовления вакцины, получают от SPF кур.

Для инкубации используют яйца, в граммe желтка которых, содержится: витамина А–6–8мкг, витамина В 2–4–8мкг и каратиноидов не менее 15мкг. Оценку качества инкубационных яиц проводят по методикам, составленным Всероссийским научно-исследовательским институтом птицеводства.

На инкубационное яйцо отправитель должен выдать (а получатель взять) ветеринарное свидетельство, в котором подтверждается благополучие хозяйства по инфекционным заболеваниям птиц и пригодность яйца для инкубации.

Для инкубации отбирают биологически полноценные яйца весом не менее 52 грамм. Они должны быть получены от кур яйценокских пород не менее 9-месячного возраста. Инкубационное яйцо должно храниться при температуре 2–12°С и относительной влажности воздуха 75–80% в оборудованном вентиляцией и холодильной установкой яйцескладе.

Инкубации подлежат яйца не более 6-суточного срока хранения от

момента яйцекладки до начала инкубирования.

Инкубационные яйца должны быть чистыми, правильной формы с хорошей плотной скорлупой, при овоскопировании желток должен располагаться в центре яйца.

Воздушная камера (пуга) должна быть в тупом конце яйца, неподвижна, размером не более трехкопеечной монеты. Не пригодны для инкубации яйца с трещинами и дефектами скорлупы (насечки, известковые наросты, двухжелтковые или со смещенным желтком, кровавые или другие включения, оторванные градинки, смещенная или подвижная камера, грязные и мытые).

При отрицательной температуре наружного воздуха, яйца в инкубаторий должны доставляться специальным транспортом с температурой воздуха в кузове не ниже 2°C.

Перед закладкой в инкубатор яйца должны быть подвергнуты дезинфекции парами формальдегида. Для этой цели используется специальная дезкамера, при отсутствии таковой дезинфекция яйца допускается непосредственно в инкубационном шкафу.

Для создания необходимой концентрации паров формальдегида, в расчете на 1м³ камеры расходуется 30 см³ формалина, 10 см³ воды и 2 г калия марганцевокислого (KMnO₄). Дезинфекцию осуществляют следующим образом: в плоскую эмалированную или глиняную посуду наливают 30 см³ формалина, 10 см³ воды и 2 г калия марганцевокислого и быстро закрывают двери камеры (шкафа). Продолжительность дезинфекции 15–20 минут. Пары формальдегида удаляют через вентиляционные отверстия. Оставшиеся в камере (шкафу) пары формальдегида нейтрализуют аммиаком (нашатырным спиртом), которого берут вдвое меньше израсходованного формалина и распыляют в камере (шкафу) посредством генератора аэрозолей или пульверизатором.

В процессе инкубации яиц необходимо осуществлять контроль за развитием зародыша и анализировать причины гибели эмбрионов. Первое просвечивание яиц проводят через 5–7 дней после закладки. Гибель зародышей не должна превышать 2% от общего числа инкубируемых куриных эмбрионов. В нормально развивающихся эмбрионах хорошо выражена кровеносная система. Эмбрионы, до их заражения, инкубируют в соответствии с зоотехническими требованиями при выведении цыплят.

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц используют следующие реактивы и оборудование:

- натрий хлористый, «х.ч.», ГОСТ 4233-77;
- 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;
- 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 ректифицированный технической марки «Экстра М», ТУ ВУ 700068910.014-2005;
- инкубаторы для куриного яйца, вместимостью 200–2000 яиц (Maino Enrico, Италия) или других производителей);
- термостаты с температурой нагрева плюс $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и от плюс 20°C до плюс 24°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;
- 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);
- 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;
- SPF РКЭ;

2.3 Культивирование вируса ИЛТ в РКЭ.

2.3.1 Культивирование штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц в РКЭ.

Материалом для заражения РКЭ служат изучаемые или музейные штаммы вируса инфекционного ларинготрахеита птиц.

Для получения матровой раскладки вакцинного штамма содержимое трех ампул разводят 1:1000 стерильным физиологическим раствором (рН 7,2–7,4, содержащим 200 ЕД/пенициллина и 200мкг/см³ стрептомицина и заражают хорошо развитые 9–10 дневные куриные эмбрионы на хориоаллантоисную оболочку в области пуги (в объеме $0,2 \text{ см}^3$).

Зараженные куриные эмбрионы инкубируют 120 ч при температуре $37,0\text{--}38,0^\circ\text{C}$ и относительной влажности 60–70%. Овоскопирование заражен-

ных эмбрионов проводят один раз в сутки. Для получения матровой расплодки вируса ИЛТ используют вирусосодержащий материал от павших и от оставшихся, имеющих характерные изменения в процессе инкубирования, живых эмбрионов. Эмбрионы, павшие в течение первых 24 часов, уничтожают (неспецифическая гибель). Оставшиеся в живых и погибшие после инкубирования эмбрионы выдерживают при температуре 2–6°C не менее 16 часов. Перед вскрытием эмбрионы выдерживают 2–3 часа при комнатной температуре до испарения конденсата (влаги) на скорлупе.

После охлаждения отобранные эмбрионы в стерильных условиях раскладывают на предварительно профламбированные металлические лотки, обрабатывают спиртовым факелом (кратковременно), глазными ножницами вскрывают со стороны тупого конца (естественной пуги). Отбирают экстраэмбриональную жидкость и хориоаллантоисную оболочку в отдельные, стерильные, плотно закрывающиеся емкости. Хориоаллантоисные оболочки измельчают на гомогенизаторе при 1500 об/мин в течение 3–5 мин до однородного состояния. Полученный гомогенат смешивают с экстраэмбриональной жидкостью и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость фильтруют (стерильная марля) в стерильные емкости.

Из каждой емкости с вирусосодержащим материалом делают высевы в 2 пробирки с МПА, МППБ под вазелиновым маслом на бактериальное загрязнение и 2 пробирки со средой Сабуро на исключение контаминации грибами. Пробирки с посевами на исключение контаминации бактериальной микрофлорой выдерживают в термостате при 37–38°C 10 дней, а на контаминацию грибами при температуре 20–24°C 10 дней с ежедневным просмотром сред. До выяснения результатов проверки взятых образцов на стерильность, емкости с вирусосодержащим материалом хранят при температуре не выше минус 20°C.

Содержимое одного из флаконов используют для определения стерильности, биологической активности вируса (она должна быть не ниже $10^{5,5}$ ЭИД_{50/мл} для ИЛТ). Если биологическая активность вируса окажется ниже, чем $10^{5,5}$ ЭИД_{50/мл} для ИЛТ или он нестерилен, то матровую расплодку не используют. Все работы по приготовлению матровых расплодок проводятся в специально закрепленном боксе опытным ветврачом-микробиологом.

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

3.1 Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов вируса ИЛТ определяют методом титрования в SPF ПКЭ.

3.2 Для этого из общей пробы вирусосодержащей жидкости отбирают 1 см³, из отобранной пробы готовят последовательные 10-кратные разведения вирусосодержащего материала (10^{-1} – 10^{-8}) на стерильном растворе натрия хлорида с массовой долей 0,9% (рН 7,2). Перед заражением скорлупу яйца в области воздушной камеры протирают спиртовым раствором с массовой долей

йода 5% и фламбируют. Каждым разведением вакцины, начиная с 10^{-8} до 10^{-1} , заражают по 4 эмбриона на ХАО в объеме $0,2 \text{ см}^3$. В качестве контроля оставляют 4 эмбриона, которые не заражают. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубируют в течение 168 ч при $(37-38)^\circ\text{C}$ и относительной влажности 60–70%. Овоскопию зараженных эмбрионов проводят 2 раза в сутки.

Эмбрионы, павшие в первые 24 ч после заражения, уничтожают, считая их гибель неспецифической. Через 168 ч все эмбрионы вскрывают (в том числе и мертвые). Титр вируса ИЛТ определяют, учитывая изменения эмбрионов, характерные для данного возбудителя (уплотнение ХАО с образованием на ней мелкозернистых и крупнозернистых бляшек серо-белого цвета; помутнение и «тягучесть» эмбриональной жидкости).

Титр вируса рассчитывают по формуле Рида и Менча (1):

$$\lg \text{ЭИД}_{50} / 0,2 \text{ см}^3 = \lg B + \frac{b-50}{b-a} \times \lg d, \text{ где} \quad (1)$$

$\lg \text{ЭИД}_{50} / 0,2 \text{ см}^3$ – титр вируса в $0,2 \text{ см}^3$, способный вызвать инфицирование 50% зараженных эмбрионов;

B – разведение, дающее эффект более 50%;

b – % летальности, соответствующий разведению, дающему эффект более 50%;

a – % летальности, соответствующий разведению, дающему эффект менее 50%;

d – коэффициент разведения.

Титр вируса в $1,0 \text{ см}^3$ рассчитывают по формуле (2)

$$\lg \text{ЭИД}_{50} / \text{см}^3 = \lg \text{ЭИД}_{50} / 0,2 \text{ см}^3 + 0,7 \lg \quad (2)$$

Инфекционная активность производственных штаммов вируса ИЛТ должна быть не ниже $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50} / \text{см}^3$.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

4.1 Специфичность штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц определяют в реакции нейтрализации со стандартными гипериммунными сыворотками.

4.2 Для изучения специфичности штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц используют следующие реактивы и оборудование:

- баня водяная;
- термостат с температурой нагрева $37-38^\circ\text{C}$;
- холодильник с морозильной камерой;
- штативы;
- горелки газовые или спиртовые;
- пробирки бактериологические;
- пробки резиновые;

- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 и 100 см³ по ГОСТ 20292-74;

- измельчитель ткани;

- потенциометр;

- чашки Петри по ГОСТ 25336-82;

- стекла предметные по ГОСТ 9284-75;

- натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;

- воду дистиллированную по ГОСТ 6709-72;

- пенициллин;

- стрептомицин;

- эмбрионы куриные 9–12-суточного возраста;

- культуру клеток почек куриных эмбрионов и цыплят;

- среды питательные для культуры клеток.

4.3 Подготовка к исследованию

4.3.1 Антиген для проведения реакции нейтрализации готовят из хорион-аллантаической оболочки куриных эмбрионов с характерными для данного вируса изменениями. Хорион-аллантаическую оболочку гомогенизируют с равным количеством буферного изотонического раствора с рН от 7,2 до 7,4, к которому добавлены антибиотики из расчета по 100 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 см³ раствора.

Суспензию центрифугируют в течение 10 мин с частотой вращения 1500–2000 об/мин.

Надосадочную жидкость сливают и используют в качестве антигена, если она содержит вируса не менее 10^{5,0} ЭИД₅₀/см³. До употребления антиген сохраняют в запаянных ампулах в замороженном состоянии.

4.3.2 Сыворотки (больных и переболевших птиц, контрольные положительные и отрицательные сыворотки птиц) инактивируют в водяной бане при температуре 56°С в течение 30 мин и до начала исследования сохраняют также в замороженном состоянии.

4.3.3 Проведение исследования.

Реакцию нейтрализации проводят на куриных эмбрионах или на культурах клеток, используя постоянные количества сыворотки и прогрессивно нарастающие 10-кратные разведения вируса-антигена.

Реакция нейтрализации проводится в соответствии с таблицей 2.

В штатив ставят несколько рядов стерильных пробирок. Число рядов соответствует числу испытуемых сывороток, а число пробирок в ряду – числу разведений вирусного антигена. Во все пробирки из ряда вносят по 0,5 см³ соответствующей сыворотки. Параллельно с этим ставят контрольный опыт с нормальной (известной отрицательной) и иммунной (известной положительной) сыворотками против инфекционного ларинготрахеита в этой же дозе. Затем во все пробирки с испытуемыми и контрольными сыворотками добавляют одинаковое количество (0,5 см³) соответствующих 10-кратных разведений вирусного антигена. Антиген можно разливать одной и той же пипеткой, если начать с самого большого разведения. Пробирки встряхивают энергично

и оставляют при комнатной температуре в течение суток.

Таблица 2 – Схема постановки реакции нейтрализации

Номер ряда	Номер пробирки	Нормальная сыворотка, см ³	Иммунная сыворотка, см ³	Разведение вируса				
				1:5	1:50	1:500	1:5000	1:50000
1	1	0,5	–	0,5	–	–	–	–
	2	0,5	–	–	0,5	–	–	–
	3	0,5	–	–	–	0,5	–	–
	4	0,5	–	–	–	–	0,5	–
	5	0,5	–	–	–	–	–	0,5
2	1	–	0,5	0,5	–	–	–	–
	2	–	0,5	–	0,5	–	–	–
	3	–	0,5	–	–	0,5	–	–
	4	–	0,5	–	–	–	0,5	–
	5	–	0,5	–	–	–	–	0,5

Каждым разведением инокулируют по 4–5 эмбрионов (или 4–5 пробирок культуры клеток) путем инокуляции на хорион-аллантаической оболочке или в хорион-аллантаическую полость в количестве 0,2 см³.

Эмбрионы инкубируют при температуре 37°C на протяжении 6 суток, проводя овоскопию ежедневно не менее одного раза. Погибшие в первые 24 ч эмбрионы отбрасывают, а остальные вскрывают на 6 сутки для выявления специфических изменений на поверхности хорион-аллантаической оболочки.

В реакции нейтрализации используются неразведенные сыворотки, так как могут возникнуть некоторые нежелательные различия между нейтрализационными индексами одной и той же сыворотки, использованной в разведенном и неразведенном состоянии. При недостаточном количестве сыворотки ее разводят до необходимого минимума (1:2, 1:3 и т. д.). В этом случае полученный индекс нейтрализации умножают на соответствующий фактор разведения (1:2, 1:3 и т. д.).

4.3.4 Обработка результатов.

Эмбриональную инфекционную дозу 50% (или инфекционную дозу 50% в культурах тканей) вычисляют отдельно для каждой сыворотки на основании полученных результатов реакции нейтрализации. Индекс нейтрализации представляет разность между логарифмическими показателями титров вируса в присутствии нормальной (отрицательной) и иммунной (положительной) сывороток, подсчитанную по Риду и Менчу. Найденное по таблице антилогарифмов число будет являться индексом нейтрализации.

Вирусный изолят, который нейтрализуется положительной сывороткой против инфекционного ларинготрахеита с индексом выше 50, идентифицируют как вирус инфекционного ларинготрахеита.

Сыворотку с индексом нейтрализации 10 или меньше в реакции нейтрализации с известным штаммом вируса инфекционного ларинготрахеита считают отрицательной, сыворотку с индексом 11–49 – сомнительной, с

индексом 50 и выше – положительной.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

5.1 Антигенную активность штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц проводят путем изучения иммунного ответа у лабораторных животных после введения испытуемых вирусов.

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц используют следующие реактивы и оборудование:

- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- ножницы, ГОСТ 21239;
- пинцеты, ГОСТ 21241;
- весы лабораторные высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 200 г, ГОСТ 24104;
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709;
- пипетки 5-2-1, 5-2-2, 6-2-5, ГОСТ 29228;
- 30 SPF-цыплят 15-дневного возраста;
- набор для определения антител к вирусу инфекционного ларинготрахеита птиц методом иммуноферментного анализа (ИФА) фирмы «Синко», Россия или наборы других производителей.

5.3 Проведение испытания.

Отбирают 30 SPF-цыплят 15-суточного возраста и из них 20 цыплят иммунизируют изучаемым штаммом, а 10 оставляют в качестве контроля. Через 21 сутки после вакцинации исследуют индивидуальные сыворотки, полученные из крови цыплят контрольной и опытной группы до и после вакцинации.

5.4 Учет результатов.

Для определения антигенной активности вируса ИЛТ сыворотки цыплят каждой группы исследуют методом ИФА, согласно наставлению по применению набора для определения антител к вирусу инфекционного ларинготрахеита птиц иммуноферментным методом (ИФА).

Средний арифметический титр антител к вирусу ИЛТ в сыворотках, полученных от привитых цыплят должен быть не ниже 1:400 с наборами фирмы «Синко» в ИФА у 80% и более привитых цыплят.

Штамм считается иммуногенной, если титр антител у 80% и более привитых цыплят при исследовании в ИФА не ниже 1:400 в наборах IDEXX и 1:500 в наборах ВНИИЗЖ.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

Генетическая идентичность и принадлежность штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита птиц в биологических пробах определяется с ис-

пользованием тест-системы VetPCR ILTV (BioinGentech) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

6.1 Комплектация:

- VetPCR™ ILTV смесь;
- внутренний контроль;
- ILTV положительный контроль;
- отрицательный контроль;
- вода освобожденная от РНКаз и ДНКаз;
- маркер молекулярной массы (Brig™);
- набор для выделения ДНК.

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 ДНК вируса инфекционного ларинготрахеита птиц основан на амплификации специфического участка ДНК полученной из биологического материала за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы.

6.4 Порядок отбора и подготовки проб.

Тест-система предназначена для выявления ДНК вируса инфекционного ларинготрахеита в биологическом материале методом ПЦР.

Для исследования генома вируса инфекционного ларинготрахеита 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 0,5-1см³ (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 транслюминатор 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 накопечники 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 B», ADRONA (Латвия);
- паровой автоклав;
- ионметр (рН - метр);
- кюветы эмалированные 25x15 см²;
- ножницы остроконечные;
- пинцеты хирургические и анатомические;
- шприцы типа «Рекорд» ГОСТ 22967-97 – 1 мл и 5 мл;
- иглы инъекционные ГОСТ 25377-87;
- вода дистиллированная ГОСТ 6709;
- халаты и одноразовые перчатки из латекса;
- комплект средств для обработки рабочего места.

6.6 Реагенты:

- клеточный лизирующий раствор;
- ядерный лизирующий раствор;
- протеиназа К;
- раствор РНКаз;
- промывочный раствор;
- протеин преципитирующий раствор;
- раствор для ДНК.

6.7 ПЦР-анализ.

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

6.7.1 Экстракция ДНК из исследуемого материала.

Выделение ДНК из крови

Лизис эритроцитов

1 Смешать 200 мкл образца с 900 мкл лизирующего раствора клеток, перемешать;

2 Инкубировать 5 минут при комнатной температуре;

3 Центрифугировать: 13g – 2 минуты;

4 Отобразить надосадов. Осадок перемешать на вортексе;

5 Если осадок не белого цвета, повторить пункты 1–4.

Лизис ядер

6 Добавить к осадку 120 мкл раствора для лизиса ядер, перемешать;

7 Добавить 2 мкл протеиназы К к раствору, инкубировать 30 минут при температуре 55–65°C;

8 Инкубировать при 90°C – 3 минуты;

9 Добавить в раствор 1 мкл РНКазы, инкубировать 20 минут при температуре 30–40°C.

Осаждение белка

10 Добавить 42 мкл протеин преципитирующего раствора, перемешать на вортексе в течение 20 сек;

11 Центрифугировать по пункту 3.

ДНК преципитация и регидратация

12 Супернатант смешать с 150 мкл изопропанола и перемешать;

13 Центрифугировать по пункту 3;

14 Удалить надосадов. К осадку добавить 150 мкл 70% этанола;

15 Центрифугировать по пункту 3;

16 Удалить надосадов. Осадок сушить на воздухе 10–15 минут;

17 Добавить к осадку раствор для ДНК, инкубировать 5 минут при температуре 65°C или ночь при 4°C.

Выделение ДНК из культуры клеток и ткани

Пробоподготовка культуры клеток:

Центрифугировать культуру клеток 200 мкл 13,3–16 g в течение 2-х минут. Полученный осадок промыть ЗФР (забуференный физраствор). К осадку добавить 120 мкл ядерного лизирующего раствора, перемешать.

Пробоподготовка ткани:

К 5–10 мг измельченной ткани добавить 120 мкл ядерного лизирующего раствора. Инкубировать 15–30 минут при температуре 65°C.

Лизис и протеин преципитация

1 Добавить 1,5 мкл раствора РНКаз к ядерному лизату клеток или ткани; Инкубировать 15–30 минут при температуре 37°C;

2 Добавить 45 мкл протеин преципитирующего раствора, перемешать и охладить на льду 5 минут;

3 Центрифугировать 13–16 g – 3 минуты.

ДНК преципитация и регидратация

4 Перенести супернатант в новую микропробирку с 300 мкл изопропанола комнатной температуры;

- 5 Перемешать, переворачивая микропробирку;
- 6 Центрифугировать 13–16 г – 2 минуты;
- 7 Удалить супернатант и добавить 300 мкл комнатной температуры 70% этанола;
- 8 Центрифугировать (как в пункте 6);
- 9 Удалить супернатант и сушить на воздухе осадок 15 минут;
- 10 Добавить к осадку раствор для ДНК, инкубировать 5 минут при температуре 65°C или ночь при 4°C.

6.7.2 Амплификация.

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

Таблица 3 – Приготовление реакционной смеси

Компоненты набора	Образец	Положительный контроль	Отрицательный контроль	Внутренний контроль
VetPCR™ ИЛТ смесь	5,5 мкл	5,5 мкл	5,5 мкл	
ПЦР внутренний контроль				5,5 мкл
вода свободная от РНК-аз	6 мкл	6 мкл	6 мкл	6 мкл
ДНК изолированная из образца	2 мкл			2 мкл
ИЛТ 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 ДНК инфекционного ларинготрахеита птиц

Этап	Температура	Время
1	94 °С	2 мин
2	94 °С	30 с
	55 °С	30 с
	72 °С	30с
	цикл повторить 30 раз	
3	72 °С	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 °С до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 16°C.

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

6.7.3 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 ДНК 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⁺ и, желательнее, маркер молекулярных масс ДНК.

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, переене-

сти гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

6.7.4 Учет и интерпретация результатов

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной части ДНК вируса инфекционного ларинготрахеита птиц. Длина амплифицированного специфического фрагмента ДНК вируса инфекционного ларинготрахеита птиц должна быть 399 п.н., внутреннего контроля – 149 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

Анализ проводится в три этапа в трех отдельных помещениях (зонах) согласно правил проведения работ в диагностических лабораториях, использующий метод полимеразной цепной реакции.

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

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.

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.

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 инфекционного ларинготрахеита птиц на SPF-эмбрионах, определению его инфекционной активности, видовой принадлежности, специфичности, антигенной и генетической идентичности позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать штаммы вируса и использовать их в 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 инфекционного ларинготрахеита птиц

Подписано в печать 02.03.2016.
Формат 60x90 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 0,93 Тираж 60 экз. Заказ № 138.
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»

