

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И  
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРНОГО И  
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО НАДЗОРА**

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

УТВЕРЖДАЮ

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

А.М.Субботин

« 11 » *сентября* 2016 г.



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

МИНСК 2016

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

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

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

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

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

**Рецензенты:**

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

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

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

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

## ВВЕДЕНИЕ

Из инфекционных заболеваний крупного рогатого скота инфекционный ринотрахеит – одно из наиболее распространенных заболеваний.

**Инфекционный ринотрахеит** – пустелезный вульвовагинит (ИРТ) – остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся поражением дыхательных путей, лихорадкой, общим угнетением и конъюнктивитом, а также у взрослых животных проявляется пустуллезным вульвовагинитом и баланопоститом.

Возбудителем инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота является ДНК-геномный вирус, принадлежащий к семейству *Herpetoviridae*, роду *Herpesvirus I*.

В естественных условиях инфекционным ринотрахеитом болеет крупный рогатый скот, особенно тяжело – телята и молодняк на откорме. Кроме того, генитальная форма заболевания установлена у беловежских зубров. Источником возбудителя инфекции являются больные и переболевшие животные, выделяющие вирус 6–12 месяцев после выздоровления. Очень опасны быки-производители, переболевшие генитальной формой и длительное время содержащие вирус в сперме. На комплексах по выращиванию крупного рогатого скота инфекционный ринотрахеит проявляется в виде периодических вспышек, возникающих на 5–7-й день после завоза сборного поголовья телят, предназначенных для комплектования групп животных в помещениях комплексов и ферм. К вирусу инфекционного ринотрахеита чувствителен плод крупного рогатого скота: внутриутробное заражение приводит к его гибели или возникновению иммунологической толерантности.

В зависимости от локализации патологического процесса различают несколько форм болезни – респираторную, конъюнктивальную, нервную, генитальную, абортивную, кожную, стомальную, энтеральную. Генитальная форма проявления инфекционного ринотрахеита у коров протекает с признаками воспаления слизистой оболочки с последующей некротизацией эпителия с образованием пустул и язв. У стельных животных вирус ИРТ может вызывать гибель эмбриона, на более поздних стадиях стельности – гибель плода и аборт или же рождение нежизнеспособных, гибнущих в первые сутки телят. Респираторная форма заболевания наиболее часто встречается у молодняка, хотя могут поражаться и взрослые животные. Заболевание клинически проявляется повышением температуры тела, стойкой гиперемией, воспалением слизистых оболочек носа, выделением вначале серозного, а затем слизисто-гнойного экссудата.

Для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота используют живые и инактивированные моно- и ассоциированные вакцины, гипериммунные сыворотки. Конструирования вакцин и диагностических тест-систем требуются аттестованные и депони-

рованные производственные или эпизоотические штаммы вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

В настоящих методических указаниях приведены требования и описаны методы изучения культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных и эпизоотических штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

## **1 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ И КОНТРОЛЬНЫМ ШТАММАМ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ, ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК, ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН**

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

1.2 Штамм вируса 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  $0,5 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл в течение 12 месяцев).

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

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

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

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

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

1.10 Необходимые требования к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота:

Таблица 1 – Требования к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса в монослое клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК	часы	48–72
2	оптимальная доза заражения	ТЦД <sub>50</sub> /мл	0,2–1,0
3	оптимальное значение pH при репродукции	ед. pH	7,2–7,6
4	оптимальная температура репродукции	град. С	36,0–37,5
5	титр инфекционности после репродукции в монослое клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК	lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	6,0 и выше
6	контаминация	кол-во колоний в мл.	не допускается
7	типоспецифичность	типсовая принадлежность	типоспецифичен
8	генетические свойства	генетическая принадлежность	должен соответствовать по генетическим свойствам положительному контролю

## 2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Культуры клеток, предназначенные для культивирования вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота с целью изучения морфологических свойств вируса, должны характеризоваться высокой пролиферативной активностью (индекс пролиферации от 3,0 до 4,0), а также чувствительностью к вышеуказанному вирусу. Популяции клеток должны обладать устойчивостью к криоконсервированию (жизнеспособность 95–99%

при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение 10 лет); при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  должны храниться до 10 суток (жизнеспособность 90–95%).

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

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

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

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

- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020–0,20, 0,20–1,0  $\text{cm}^3$  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  $\text{cm}^3$  и до 1,0  $\text{cm}^3$  («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

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

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс  $2^{\circ}\text{C}$  до плюс  $8^{\circ}\text{C}$  по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;

- $\text{CO}_2$ -инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5%  $\text{CO}_2$  и температуру нагрева плюс  $(37\pm 1,0)^{\circ}\text{C}$  (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- стаканы стеклянные вместимостью 50  $\text{cm}^3$  ГОСТ 25336;

- пипетки 1, 5, 10  $\text{cm}^3$  по ГОСТ 29227;

- флакон вместимостью 50  $\text{cm}^3$  по действующим ТНПА;

- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

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

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

- культура клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК;

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

2.3 Выращивание клеток в монослое.

2.3.1 Реконсервирование клеток.

Для культивирования используют клетки MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК, хранившиеся в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) в ампулах объ-

емом 10–75 мл или в морозильнике при температуре  $-85^{\circ}\text{C}$ , в пластиковых флаконах объемом от 100 до 500 мл. Ампулы или флаконы с суспензией клеток извлекают из хранилища, помещают в водяную баню с температурой  $40^{\circ}\text{C}$  и выдерживают до полного оттаивания.

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

### 2.3.2 Подсчет концентрации клеток.

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

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

X – количество клеток в 1 мл;

A – общее количество клеток в камере;

B – разведение суспензии.

Клетки используют для выращивания в монослое.

### 2.3.3 Выращивание клеток в монослое.

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

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

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

На следующем пассаже пересев осуществляют в 1,5-литровом матрасе, проводя все операции как описано выше. Таким образом, проводят ещё 2–3 пассажа, каждый раз увеличивая количество матрасов в 2–3 раза, в те-

чение которых клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства.

#### 2.3.4 Кримоконсервирование клеток.

Для успешного кримоконсервирования клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК, выращенных в монослое, необходимо брать их в конечной стадии логарифмического роста. С стекла монослой клеток 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 свежую ростовую среду и доводят до концентрации 20–35 млн. клеток/мл. В концентрат клеток добавляют 5–7% полиэтиленгликоля ММ 6000 и сразу расфасовывают в ампулы, которые запаивают на кислородной горелке или в полистироловые флаконы. Ампулы и флаконы маркируют и помещают в контейнеры. Экспозиция с кримопротектором 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  $-30^{\circ}\text{C}$  ( $1-2^{\circ}\text{C}$  в мин); на втором этапе до  $150^{\circ}\text{C}$  ( $8-10^{\circ}\text{C}$  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 инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота к культивированию.

Материалом для заражения монослойных культур клеток служат штаммы вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. С учётом титра вируса, указанного в паспортах, музейный вирус разводят питательной средой для выращивания клеток из расчёта 0,5–0,8 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. Затем с помощью поддерживающей среды доводят заражающую дозу вируса, предназначенную для заражения матраса, до 5–10 мл. Приготовленный вирусный материал инокулируют в матрасы с культурой клеток, которые предварительно дважды отмывают той же средой от остатков ростовой среды. Затем в течение 60 минут осуществляют адсорбцию вируса на клетках при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . После указанной экспозиции инокулят сливают, а монослой трижды отмывают поддерживающей питательной средой с рН 7,4–7,6. Затем в матрасы вносят по 150 мл поддерживающей питательной среды с антибиотиками: пенициллином и стрептомицином из расчёта 100–200 Ед/мкг каждого.

Инкубацию зараженных клеточных культур проводят при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  до появления в монослое специфического ЦПД на 20–25% (48 ч). После замораживания и оттаивания культуральную вирусосодержащую



жидкость сливают в одну емкость, корректируют pH до 7,2–7,6 и расфасовывают в пенициллиновые флаконы по 10 мл, маркируют (этикетировать) и хранят при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$ .

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

Второй и третий пассаж проводят аналогичным способом. После оттаивания вируса первого пассажа в водяной бане при  $40^{\circ}\text{C}$  его вносят на монослойные культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК по 5 мл на матрас или по 10 мл на роллер. Клеточные культуры предварительно отмывают от ростовой среды. Адсорбцию вируса на клетках проводят в течение 60 минут при  $37^{\circ}\text{C}$ , после чего монослой клеток отмывают 2–3 раза питательной средой и вносят в матрас по 150 мл поддерживающей среды с pH 7,5–7,6. Инкубируют при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  до появления ЦПД на 75–90%. После замораживания-оттаивания и корректировки pH вирусосодержащую жидкость второго пассажа в необходимом количестве фасуют в пенициллиновые флаконы по 10 мл, а остальной вирусный материал – по 100–300 мл и хранят при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$ .

2.3.6 Характерные изменения клеток под воздействием вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

ЦПД вируса инфекционного ринотрахеита проявляется не ранее, чем через 48 часов и характеризуется появлением многоядерных клеток с последующим их округлением в виде «гроздьев винограда».

### **3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

3.2 Последовательные десятикратные разведения вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота крупного рогатого скота от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  готовят в 24-луночном планшете. Для этого в 8 лунок вносят по  $0,9\text{ см}^3$  питательной среды. Затем в первую лунку вносят  $0,1\text{ см}^3$  нативного вируса, получая его разведение  $10^{-1}$ . После тщательного перемешивания содержимое первой лунки переносят по  $0,1\text{ см}^3$  во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса до  $10^{-8}$  включительно.

Из культурального планшета с выращенным монослоем культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку, переносят в

соответствующие лунки с клеточным монослоем по  $0,1 \text{ см}^3$  каждого разведения вируса  $10^{-1}$ , затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по  $0,1 \text{ см}^3$  разведения вируса  $10^{-2}$  и так далее до разведения  $10^{-8}$  включительно.

В качестве контролей служат:

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

Культуру клеток в планшетах инкубируют в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 5%  $\text{CO}_2$  и температуре  $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ .

Учет реакции проводят путем микроскопирования монослоя клеток спустя 2 суток после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учет проводят на 5-6 день инкубации.

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

Инфекционная активность производственных штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота крупного рогатого скота должна быть не ниже  $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

#### **4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

4.1 Специфичность штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота определяют в реакции нейтрализации со стандартными гипериммунными сыворотками.

4.2 Для изучения специфичности штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

- аппарат для промывки планшетов MINI-WASHER-350 («Organon Teknika», Нидерланды или других изготовителей, при необходимости);
- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз  $0,020\text{--}0,20$ ,  $0,20\text{--}1,0 \text{ см}^3$  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  $0,30 \text{ см}^3$  и до  $1,0 \text{ см}^3$  («Plastibrand», Германия или других изготовителей);
- секундомер по ГОСТ 577;
- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс  $(37 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  («Thermo», США или аналогичный других изготовителей);

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°C до плюс 8°C по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;
- шейкер для планшет FS-4 (при необходимости), («Labotek», Дания или других изготовителей);
- CO<sub>2</sub>-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO<sub>2</sub> и температуру нагрева плюс (37±1,0)°C (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);
- пипетки 1, 5, 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 29227;
- цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770;
- флакон вместимостью 50 см<sup>3</sup> по действующим ТНПА;
- среда Игла MEM («Sigma»,США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;
- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (фетальная сыворотка), ("HyClone" или других изготовителей);
- культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК (почки теленка) из банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»;
- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (отрицательная фетальная сыворотка), («HyClone» или других изготовителей);
- сыворотка гипериммунная против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (IDEXX или Hirpa);

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

4.3.1 Реакцию ставят методом разведения вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup> с постоянной дозой гипериммунной сыворотки в разведении 1:10 и отрицательной (фетальной) сыворотки крупного рогатого скота в разведении 1:10. Последовательные десятикратные разведения вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup> готовят в 24-луночной планшете. Разведение вируса проводят по методу, описанному в п.3.2.

Затем в каждую лунку стерильного 24-луночного планшета вносят по 0,5 мл каждого разведения вируса и добавляют по 0,5 мл гипериммунной сыворотки в разведении 1:10.

Аналогично производят смешивание отрицательной сыворотки с различными разведениями вируса.

Смесь сывороток с вирусом осторожно перемешивают, планшет закрывают крышкой и помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор, где выдерживают при 5% CO<sub>2</sub> и температуре плюс (37,0±1,0)°C в течение 1 часа.

4.3.2 Из планшет с выращенным с выращенным монослоем культур клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку, переносят в первые 4 лунки с клеточным монослоем по 0,2 см<sup>3</sup> смеси сыворотки в разведении 1:10 и вируса в разведении 10<sup>-1</sup>. Затем в следующие 4 лунки с

культурой клеток вносят по 0,2 см<sup>3</sup> смеси сыворотки 1:10 и вируса разведения 10<sup>-2</sup> и так далее до разведения 10<sup>-8</sup> включительно.

Аналогично вносят на монослой отрицательную сыворотку с различными разведениями вируса.

4.3.3 В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и 0,1 см<sup>3</sup> поддерживающей среды);

- контроль вируса (по 4 лунки с культурой клеток, зараженных разведениями вируса 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>);

- контроль гипериммунной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с 0,05 см<sup>3</sup> гипериммунной сыворотки и 0,15 см<sup>3</sup> среды);

- контроль отрицательной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с 0,05 см<sup>3</sup> отрицательной сыворотки и 0,15 см<sup>3</sup> среды).

Культуру клеток в пробирках инкубируют в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% СО<sub>2</sub> и температуре (37,0±1,0)°С.

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

4.3.4 Видовую принадлежность вируса и его специфичность определяют по разности показателей между отрицательной и положительной сыворотками. Разница должна быть не менее, чем на 2,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

## **5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

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

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

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

- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30 см<sup>3</sup> и до 1,0 см<sup>3</sup> («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- секундомер по ГОСТ 577;
- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс  $(37 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  («Thermo», США или аналогичный других изготовителей);
- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс  $2^\circ\text{C}$  до плюс  $8^\circ\text{C}$  по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;
- шейкер для планшет FS-4 (при необходимости), («Labotek», Дания или других изготовителей);
- CO<sub>2</sub>-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO<sub>2</sub> и температуру нагрева плюс  $(37 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);
- стаканы стеклянные вместимостью 50 см<sup>3</sup> ГОСТ 25336;
- пипетки 1, 5, 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 29227;
- цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770;
- флакон вместимостью 50 см<sup>3</sup> по действующим ТНПА;
- шприцы инъекционные однократного применения по ГОСТ 24861;
- иглы инъекционные однократного применения по ГОСТ 25046;
- бумага фильтровальная по ГОСТ 12026;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор стерильный физиологический с массовой долей 0,85% (рН 7,2–7,4);
- среда Игла MEM («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;
- сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота (фетальная сыворотка) («HyClone» или других изготовителей);
- культура клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК из банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;
- штамм вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота;
- клинически здоровые кролики живой массой по 2,5–4,0 кг – 4 головы.

5.3 Испытание проводят на четырех клинически здоровых кроликах живой массой 2,5–4,0 кг, в сыворотке крови которых отсутствуют вируснейтрализующие антитела к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, определяемые в реакции нейтрализации. Исследуемый вирус, с инфекционным титром не менее  $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  в объеме по  $3,0 \text{ см}^3$  вводят двукратно с интервалом 21 день внутримышечно каждому из четырех кроликов. Через 21 сутки после вторичной иммунизации у всех животных берут кровь с целью получения проб сывороток для последующего их исследования на наличие вируснейтрализующих антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

5.4 Постановка реакции нейтрализации с вирусом инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в планшетах.

Реакцию ставят методом разведения испытуемых сывороток, предварительно инактивированных при 56°C в течение 30 мин, с постоянной дозой вируса – 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>. Для этого на трех стерильных планшетах готовят последовательные двукратные разведения сывороток от 1:2 до 1:64 на поддерживающей питательной среде в объеме 0,1 см<sup>3</sup>, используя для каждого разведения по 4 лунки. Для этого во все используемые лунки планшетов разливают по 0,1 см<sup>3</sup> питательной среды. Затем в первые четыре лунки вносят по 0,1 см<sup>3</sup> исследуемой сыворотки крови, получая ее разведение 1:2. Содержимое первых лунок тщательно пипетируют и переносят по 0,1 см<sup>3</sup> в следующие четыре лунки. Операцию повторяют последовательно до получения разведения сыворотки от 1:2 до 1:64 включительно, удалив из последних четырех лунок по 0,1 см<sup>3</sup>.

После этого в каждую лунку с приготовленными разведениями сыворотки добавляют по 0,1 см<sup>3</sup> предварительно титрованного вируса, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>.

Смесь сыворотки с вирусом осторожно перемешивают, планшет закрывают крышкой и помещают в СО<sub>2</sub>-инкубатор, где выдерживают при 5% СО<sub>2</sub> и температуре плюс (37,0±1,0)°С в течение 1 часа.

Из планшетов с выращенным монослоем культуры клеток MDBK, ПТ-80, ПТ «Таурус», ПЭК, ЛЭК удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем по 0,2 см<sup>3</sup> смеси сыворотки в разведении 1:2 и вируса, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>. Затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по 0,2 см<sup>3</sup> смеси сыворотки в разведении 1:4 и вируса, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>, и так далее до разведения 1:64 включительно.

В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и 0,1 см<sup>3</sup> поддерживающей среды);
- контроль вируса (по 4 лунки с культурой клеток, зараженных разведениями вируса от 0,1 до 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>, десятикратным шагом и 0,1 см<sup>3</sup> среды);
- контроль сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с 0,05 см<sup>3</sup> каждой из тестируемых сывороток и 0,15 см<sup>3</sup> среды).

Культуру клеток в пробирках инкубируют в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при 5% СО<sub>2</sub> и температуре (37,0±1,0)°С.

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

Титр антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота вычисляют по общепринятой методике и выражают в логарифмах с основанием 2 (log<sub>2</sub>).

Вирус считают активным при условии, что титр антител в сыворотках крови привитых кроликов в реакции нейтрализации на культуре клеток составляет 1:16 ( $4,0 \log_2$ ) и выше.

## **6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

6.1 Генетическую идентичность и принадлежность штаммов к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота определяют с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени или идентификацией продуктов амплификации в геле агарозы.

6.2 Для проведения генетической идентификации штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота используют следующие реактивы и оборудование:

- микротермостат «БИС-М-205» (Россия) или другой;
- амплификатор «БИС-М-110», «PalmCycler» или другой;
- амплификатор для ПЦР в реальном времени «IQ5», «RotorGene» или другой;
- трансиллюминатор «УВТ-1» (Россия) или другой;
- системы обработки изображений «Биотест-Д» (Россия) или другую;
- компьютер не ниже класса Pentium-2;
- микроцентрифуга высокоскоростная;
- аппарат для горизонтального электрофореза;
- источник питания постоянного тока;
- комплект автоматических пипеток «Ленпипет» (Россия), «Gilson» (Франция), «Eppendorf» (Германия), вместимостью от 1 до 1000 мкл и наколнечники к ним;
- пробирки для микропроб емк. 0,5 и 1,5 мл, ТУ 64-2-300-80;
- набор для выделения ДНК производства ОДО «Праймтех», ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Б», «Амплисенс», «Qiagen» или аналогичные;
- агароза;
- 50x TAE буфер;
- раствор бромистого этидия (10 мг/мл);
- буфер для нанесения образца;
- вода бидистиллированную, ГОСТ 6709-72;
- тест-системы для выявления генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота различных фирм-производителей (Нарвак, Россия; IDEXX, США; BioX-Diagnostics, Бельгия; BIONOTE, Корея) в соответствии с инструкциями по применению;
- PrimeTaq-полимераза ОДО «Праймтех»;
- аммонийный буфер для полимеразы (650 мМ Трис-НСl, 166 мМ

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2% Твин 20, pH 8,8);

- дезоксинуклеотидтрифосфаты ОДО «Праймтех» 10x (2 мМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ);

- раствор хлорида магния 50 мМ;

- раймеры в концентрации 10 пмоль/мкл (GCATCGTGGAAGAAG TGG – прямой, CACCCAGTCCCAGGCTAC – обратный);

- стерильная деионизированная вода.

6.3 Материал для исследования.

Метод рассчитан на выявление ДНК в штаммах вируса ИРТ КРС и в пробах биологического материала от крупного рогатого скота.

6.4 ПЦР- анализ.

6.4.1 В случае использования коммерческих наборов для выявления генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота следуют прилагаемой инструкции.

6.4.2 Подготовка исследуемой пробы материала.

Тестируемые штаммы (вируссодержащая жидкость, лиофильно высушенные образцы) используют без разведения. Из образцов с помощью набора для выделения ДНК выделяют нуклеиновую кислоту и используют для постановки ПЦР.

6.4.3 Постановка ПЦР.

Полимеразную цепную реакцию проводят в 25 мкл реакционной смеси, содержащей стерильную деионизированную воду 11,8 мкл, раствор MgCl<sub>2</sub> (50 мМ) 1 мкл, 2,5 мкл буфера для Taq-ДНК полимеразы, 2,5 мкл 2мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, по 1 мкл каждого праймера (прямой и обратный) с концентрацией 10 пмоль/мкл, 1 ед. активности термостабильной PrimeTaq ДНК-полимеразы. В смесь добавляют выделенную ДНК (5 мкл).

Пробирки с ПЦР-смесью помещают в амплификатор со следующей программой температурно-временных циклов: T<sub>ден</sub> 94°C -5 мин; (T<sub>ден</sub> 94°C – 30 с, T<sub>отж</sub> 56°C – 30 с, T<sub>элон</sub> 72°C – 30 с) – 40 циклов; T<sub>элон</sub> 72°C – 7 мин.

После амплификации полученные продукты ПЦР анализируют в 2% агарозе (горизонтальный электрофорез).

6.4.4 Учет результатов:

50x ТАЕ-буфер разводят в 50 раз (к 20 мл буфера добавляют 980 мл бидистиллированной воды).

100 мл полученного 1x ТАЕ-буфера наливают в стеклянную колбу из термостойкого стекла объемом 250 мл, засыпают туда 2 г агарозы, добавляют 12,5 мкл раствора бромистого этидия и плавят ее на электроплитке или в микроволновой печи до полного растворения.

Далее агарозу охлаждают до 45–50°C, заливают в форму (толщина 5–6 мм) и помещают гребенки на расстоянии не менее 4 см друг от друга. После полного застывания геля (20–30 мин) осторожно вынимают гребенки, не повредив лунки.



Помещают готовый гель в электрофорезную камеру лунками в сторону отрицательного электрода. Наливают 1x TAE буфера столько, чтобы он закрыл гель на 5 мм.

Ставят пробирки с продуктами амплификации в штатив последовательно. Отбирают 12,5 мкл амплификата, смешивают с 1–3 мкл буфера для нанесения образца (бромфеноловый синий) и вносят на дно лунки. Для определения размера полученного ампликона используют стандартные маркеры – наборы фрагментов ДНК известной длины, в частности, MspI, гидролизат плазмиды pUC19. Подключают камеру к источнику тока, соблюдая полярность (направление движения образцов в геле от минуса к плюсу). Электрофорез проводят при силе тока 50 мА до тех пор, пока краситель пройдет от старта не менее половины геля (примерно 30 мин). Результаты электрофореза учитывают, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Амплифицированные фрагменты ДНК выявляются в виде светящихся желтых полос.

#### 6.4.5 Интерпретация результатов.

При наличии в исследуемой пробе вируса ИРТ КРС в геле имеются полосы размером 260 н.п.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Проведенный комплекс исследований по изучению культуральных свойств штаммов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота на первичных и перевиваемых клетках, 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, антигенных,**  
**генетических свойств и инфекционной активности**  
**производственных и эпизоотических штаммов**  
**вируса инфекционного ринотрахеита**  
**крупного рогатого скота**

Подписано в печать 02.03.2016.  
Формат 60x90 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.  
Гарнитура Times New Roman.  
Усл. печ. л. 0,93. Тираж 60 экз. Заказ № 146.  
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28  
Тел./факс (+375 17) 50 88 131  
E-mail: [bievm@tut.by](mailto:bievm@tut.by)

---

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