

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРНОГО И
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО НАДЗОРА**

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

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра - директор Де-
партамента ветеринарного и продоволь-
ственного надзора Министерства сель-
ского хозяйства и продовольствия Рес-
публики Беларусь

А.М.Субботин

« 17 » февраля 2016 г.

№ 1023/10



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

МИНСК 2016

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

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

Кныш Н.В. – старший научный сотрудник отдела болезней птиц и пчёл РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат ветеринарных наук;

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

Рецензенты:

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

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Ньюкаслская болезнь (НБ) – является высоко контагиозной вирусной инфекцией, главным образом куриных и характеризуется пневмонией, энцефалитом, множественными точечными кровоизлияниями и поражением внутренних органов. Болезнь зарегистрирована во всех странах мира, наносит громадный экономический ущерб и относится к особо опасным инфекциям.

Возбудитель болезни Ньюкасла – РНК содержащий вирус, относящийся к роду парамиксовирусов семейства *Paramyxoviridae*.

НБ поражает птицу любого возраста. Инкубационный период составляет от 5 до 15 дней. Описаны 4 формы проявления болезни. Первая форма – наиболее тяжелая – смертность достигает 90%. Основной патологоанатомический признак геморрагическое поражение пищеварительного тракта. Эта форма болезни вызывается высокопатогенными (велогенными) штаммами вируса. Летальность – до 100%. Вторая форма характеризуется поражением органов дыхания и нервной системы. Погибают от 10 до 50% зараженных птиц. Третья форма проявляется у взрослых кур в виде острого респираторного заболевания, у молодняка – иногда в виде летального нервного заболевания. Взрослая птица погибает редко. Вызывается мезогенными штаммами вируса. Четвертую наиболее легкую форму вызывают лентогенные штаммы вируса. У больной птицы наблюдают незначительные изменения респираторного и герминативного тракта (оофориты, сальпингиты).

Вирус ньюкаслской болезни птиц обладает пантропностью. Он размножается в органах иммунной системы, вызывая некроз лимфоидной ткани и иммунодефицит. Репродукция вируса в эндотелии кровеносных сосудов приводит к некрозу эндотелиальной выстилки, мукоидному и фибриноидному набуханию стенок сосудов, и в итоге – к развитию геморрагического диатеза.

Инкубационный период в среднем продолжается 4–7 дней. По течению болезнь протекает остро, подостро и хронически, различают типичную и атипичную формы болезни.

Для специфической профилактики НБ применяют инактивированные и живые вакцины. Инактивированные вакцины применяются в основном для вакцинации ремонтного молодняка в возрасте 110–120 суток. Ассортимент живых вакцин очень большой.

Для конструирования вакцин и диагностических тест-систем требуются аттестованные и депонированные производственные или эпизоотические штаммы вируса ньюкаслской болезни птиц.

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

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

1.1 Контрольные штаммы вируса ньюкаслской болезни 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* в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) или в организме естественно восприимчивого животного, сохраняя фиксированные показатели вирулентных свойств в течение не менее 10 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 ньюкаслской болезни птиц 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 испытываемого штамма вируса на этих животных.

1.9 Штамм должен культивироваться в СПФ-РКЭ или *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 ньюкаслской болезни птиц:

Таблица 1 – Требования к вирусу ньюкаслской болезни птиц

| N п/п | Показатели | Единица измерения. | Необходимые параметры |
|-------|--|--|--|
| 1 | время репродукции вируса в СПФ-РКЭ | часы | 72–96 |
| 2 | оптимальная доза заражения | ЭИД ₅₀ /0,2 см ³ | 100–1000 |
| 3 | оптимальная температура репродукции | град. С | 37,5–38,0 |
| 4 | титр инфекционности после репродукции: в РКЭ | Ig ЭИД ₅₀ /см ³ | 9,0 и выше |
| 5 | стерильность | кол-во колоний в мл. | не допускается |
| 6 | типоспецифичность | типовая принадлежность | типоспецифичен |
| 7 | генетические свойства | генетическая принадлежность | должен соответствовать по генетическим свойствам положительному контролю |

2 ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ НА РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

2.1 Общие требования к развивающимся куриным эмбрионам (РКЭ) для культивирования вируса ньюкаслской болезни птиц:

Эмбрионы, используемые для выделения вируса ньюкаслской болезни птиц из патматериала, а также для получения вирусосодержащего сырья на основе производственных штаммов, должны быть получены из хозяйств, благополучных по инфекционным болезням, в том числе и по ньюкаслской болезни птиц, скорлупа должна быть непигментированной, чистой (мыть нельзя), без трещин и насечек, без наложений или мраморности, возраст эмбриона должен соответствовать избранному методу заражения.

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

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

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов вируса ньюкаслской болезни 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 технический 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;
- спринцовка пластизольная, ТУ 33.1-24681750-003-2001;
- мешалка магнитная ММ-5, ТУ 25-11.834-80;
- 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;
- СПФ РКЭ;

2.3 Культивирование вируса НБ в РКЭ.

2.3.1 Инкубацию яиц проводят согласно «Методическим рекомендациям по инкубации яиц сельскохозяйственной птицы» г. Сергиев Посад, 2001. Яйца куриных эмбрионов, необходимых для пассажей вакцинного ви-

руса НБ и приготовления вакцины, получают от СПФ кур.

Для инкубации используют яйца, в грамме желтка которых, содержится: витамина А – 6–8мкг, витамина В2 – 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 яйценоских пород не менее 9-месячного возраста. Инкубационное яйцо должно храниться при температуре 2–12°C 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, кровяные 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 30см³ формалина, 10см³ воды и 2г калия марганцевокислого (KMnO₄). Дезинфекцию осуществляют следующим образом: в плоскую эмалированную или глиняную посуду наливают 30см³ формалина, 10см³ 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.

2.3.2 Культивирование штаммов вируса ньюкаслской болезни птиц в РКЭ.

Материалом для заражения РКЭ служат изучаемые или музейные штаммы вируса ньюкаслской болезни птиц.

Для получения первичной раскладки штамма содержимое трех ампул (флаконов) 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 в аллантаоисную полость (в объеме 0,2см³).

Зараженные куриные эмбрионы инкубируют 96 ч при температуре 37,0–38,0°С и относительной влажности 60–70%. Овоскопирование зараженных эмбрионов проводят один раз в сутки. Для получения матровой раскладки вируса НВ используют вирусосодержащий материал только от оставшихся живых эмбрионов. Эмбрионы, павшие в течение первых 24 часов, уничтожают (неспецифическая гибель). Оставшиеся в живых после инкубирования эмбрионы выдерживают при температуре 2–6°С 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 в стерильную, плотно закрывающуюся емкость. Экстраэмбриональную жидкость центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость фильтруют (стерильная марля) в стерильные емкости.

Из 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°С 10 дней, а на контаминацию грибами при температуре 20–24°С 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°С.

Содержимое одного из флаконов используют для определения стерильности, биологической активности вируса (она должна быть не ниже $10^{9,0}$ ЭИД_{50/мл} для НБ). Если биологическая активность вируса окажется ниже, чем $10^{9,0}$ ЭИД_{50/мл} для НБ или он нестерилен, то матровую расплодку не используют. Все работы по приготовлению матровых расплодков проводятся в специально закрепленном боксе опытным ветврачом-микробиологом.

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ

3.1 Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов вируса ньюкаслской болезни птиц определяют методом титрования в СПФ РКЭ.

3.2 Для этого из общей пробы вирусосодержащей жидкости отбирают 1 см^3 , из отобранной пробы готовят последовательные 10-кратные разведения вирусосодержащего материала (10^{-1} – 10^{-12}) 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^{-12} до 10^{-7} , заражают по 4 эмбриона в аллантаоисную полость в объеме $0,1 \text{ см}^3$. В качестве контроля оставляют 4 эмбриона, которые не заражают. Зараженные и контрольные эмбрионы инкубируют в течение 96–120 ч при (37–38)°С 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 96–120 ч все эмбрионы вскрывают (в том числе и мертвые), отбирают экстраэмбриональную жидкость и исследуют ее в капельной реакции гемагглютинации (РГА) с эритроцитами кур в физиологическом растворе, 1%-ная взвесь приготовленных по ГОСТ 25587.

Титр вируса рассчитывают по формуле (1):

$$\lg \text{ЭИД}_{50/0,1 \text{ см}^3} = \lg \text{ДН} - \lg \text{G} (\hat{\text{a}}\text{Li} - 0,5), \text{ где} \quad (1),$$

\lg – логарифм числа;

$\text{ЭИД}_{50/0,1 \text{ см}^3}$ – титр вакцины, т.е. наименьшее ее количество, способное вызвать инфицирование 50% зараженных эмбрионов;

ДН – максимальное разведение вакцины (10^{-7});

G – кратность разведения вируса (10);

Li – отношение количества эмбрионов, давших положительную реакцию гемагглютинации, к общему числу зараженных эмбрионов;

$\hat{\text{a}}\text{Li}$ – сумма значений Li , найденная для всех испытуемых разведений;

0,5 – постоянная величина.

Инфекционная активность производственных штаммов вируса ньюкаслской болезни птиц должна быть не ниже $9,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ

4.1 Специфичность штаммов вируса ньюкаслской болезни птиц определяют в реакции гемагглютинации (РГА) со стандартными гипериммунными сыворотками. Сущность метода заключается в способности вируса болезни Ньюкасла агглютинировать эритроциты кур.

4.2 Для изучения специфичности штаммов вируса ньюкаслской болезни птиц используют следующие реактивы и оборудование:

- пипетки пастеровские или пипетки стеклянные измерительные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292-74;
- раствор натрия хлорида (ГОСТ 4233-77) с массовой долей 0,9% (готовят по общепринятой методике);
- микротитратор Такачи.

4.3 Постановка реакции.

4.3.1 Готовят двукратные разведения вирусосодержащего материала от 1:2 до 1:1024. Для этого в ряд лунок микротитратора Такачи вносят раствор натрия хлорида (ГОСТ 4233-77) с массовой долей 0,9% в объеме 0,025 см³. Затем в первую лунку вносят 0,025 см³ вируса, трехкратно пипетируют и переносят 0,025 см³ смеси во вторую лунку и т. д. до требуемого разведения. Из последней лунки 0,025 см³ смеси удаляют в дезинфицирующий раствор (1%-ный раствор гидроксида натрия).

В каждую лунку добавляют по 0,025 см³ 1%-ной суспензии куриных эритроцитов. Планшеты с лунками встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

Контролем реакции служат две лунки (пробирки) с эритроцитами и физиологическим раствором в равных объемах, по 0,025 см³ каждого.

Образование на дне и стенках лунок (пробирок) осадка эритроцитов в виде опрокинутого «зонтика» свидетельствует о положительной РГА.

При отрицательной реакции в опыте и контроле эритроциты образуют на дне лунок (пробирок) диск с ровными краями.

Титром вируса считается предельное разведение его, при котором наблюдается полная агглютинация эритроцитов, что соответствует 1 агглютинирующей единице (1АЕ).

4.3.5 Видовую принадлежность вируса и его специфичность определяют по положительной РГА. Она должна быть не менее чем на 2 lg.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ

5.1 Антигенную активность штаммов вируса ньюкаслской болезни птиц проводят путем изучения иммунного ответа у серонегативных цыплят после введения испытуемых вирусов.

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов вируса ньюкаслской болезни 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;
- 20 SPF-цыплят 14-16-суточного возраста;
- штамм вируса инфекционного ньюкаслской болезни птиц.

5.3 Отбирают 20 SPF-цыплят 14–16-суточного возраста и из них 10 цыплят иммунизируют приготовленной пробой методом выпаивания с водой согласно Инструкции по применению, 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.

Оценку антигенной активности вакцины по вирусу ньюкаслской болезни проводят в РЗГА согласно [Методические указания по серологическому контролю напряженности иммунитета при ньюкаслской болезни птиц с помощью РЗГА, утв ГУВ СССР № 115-6а от 18.05.79 г].

Титр антигемагглютининов к вирусу ньюкаслской болезни должен быть не ниже $3,0 \log_2$ в РЗГА у 80% и более привитых цыплят. У контрольных цыплят антитела должны отсутствовать.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА ПТИЦ

Генетическая идентичность и принадлежность штаммов вируса болезни Ньюкасла птиц (NDV) определяется с использованием тест-системы VetPCR PMV-1 (BioinGentech) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологических пробах с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

6.1 Комплектация:

- 1 NDV RT-PCR Pre-смесь (VetPCR™);
- 2 NDV PCR Pre-смесь (VetPCR™);
- 3 RT-PCR раствор (Brig™);

- 4 Раствор транскриптазы (Biotech™);
 - 5 Вода, освобожденная от РНКаз и ДНКаз;
 - 6 NDV положительный контроль;
 - 7 Отрицательный контроль;
 - 8 Внутренний контроль;
 - 9 Минеральное масло;
 - 10 Маркер молекулярной массы (Brig™);
 - 11 Набор для выделения РНК.
- 6.2 Транспортирование и хранение.

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

6.3 Принцип метода.

Метод обнаружения РНК вируса болезни Ньюкасла птиц основан на амплификации специфического участка кДНК, полученной из РНК, за счет многократного повторения циклов денатурации кДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей кДНК с помощью фермента Taq-полимеразы. Результат амплификации кДНК вируса болезни Ньюкасла птиц регистрируется в режиме реального времени на каналах JOE/Yellow, FAM/Green.

6.4 Порядок отбора и подготовки проб.

Тест-система предназначена для выявления РНК вируса болезни Ньюкасла птиц в биологическом материале методом ПЦР.

Для исследования генома вируса болезни Ньюкасла птиц используют следующий биологический материал:

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

Отбор материала для исследования.

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

Из тканей и органов вырезают кусочки размером 0,5–1 см³ (толщина кусочков может быть меньше).

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

6.5 Оборудование:

- ламинар;
- микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия);
- амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США);
- персональный компьютер (Windows XP, 2 GHz, 512 Mb RAM, 80 Gb HDD, CD-RW, USB 2.0, мышь);
- камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400

- мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия);
- ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия);
 - микроволновая печь для плавления агарозы;
 - колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл;
 - мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74);
 - микроцентрифуга высокоскоростная (14 000 об/мин) Jouan (Франция);
 - комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария), вместимостью 0,1–2 мкл, 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–10 мл и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров);
 - пробирки для микропроб типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл;
 - вортекс «BIOSAN» (Латвия);
 - пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler»;
 - холодильник «Атлант МХМ 1841» (ЗАО «Атлант», РБ);
 - система для электрофореза «Consort», (Бельгия);
 - термостат SEL LAB (Германия);
 - весы RADWAG AS 220/X (Польша);
 - система подготовки чистой воды «Crystal В», ADRONA (Латвия);
 - паровой автоклав;
 - иономер (рН - метр);
 - кюветы эмалированные 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;
- РНК лизирующий буфер;
- РНК промывочный раствор;
- РНК регидрирующий раствор.

6.7 ПЦР-анализ

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

6.7.1 Экстракция РНК из исследуемого материала (зона 1).

Выделение РНК из культуры клеток:

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

- 2 Надосадек удалить;
- 4 К осадку добавить 150 мкл РНК лизирующего буфера;
- 5 Перемешать тщательно, чтобы растворить осадок. Продолжить со второго пункта основного протокола по выделению РНК.

Выделение РНК из ткани:

- 1 Добавить 500 мкл клеточного лизирующего буфера к 10–20 мг ткани;
- 2 Тщательно перемешать;
- 3 Отцентрифугировать в течение 1 минуты при 14000 оборотах в минуту;
- 4 Надосадек удалить;
- 5 Продолжить с первого пункта основного протокола по выделению РНК.

Выделение РНК из крови:

- 1 Добавить 500 мкл клеточного лизирующего буфера к 200 мкл крови;
 - 2 Инкубировать 5 минут при комнатной температуре;
 - 3 Отцентрифугировать одну минуту при 14000 оборотах в минуту;
 - 4 Надосадек удалить;
- осадок должен быть полностью белым, иначе повторить пункты 1–4;
- 5 Продолжить выделение с первого пункта протокола по выделению РНК.

Основной протокол выделения РНК:

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

16 Добавить 6 мкл BIGTH РНК раствора для регидратации.

6.7.2 Обратная транскрипция.

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

Таблица 1 – Приготовление реакционной смеси для ОТ

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

Запустить на амплификаторе программу, указанную в таблице 2

Таблица 2 – Параметры обратной транскрипции

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

6.7.3 Амплификация

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

Таблица 3 – Приготовление реакционной смеси для амплификации

| Компоненты набора | Образец | Положительный контроль | Отрицательный контроль | Внутренний контроль |
|---------------------------------------|---------|------------------------|------------------------|---------------------|
| NDV PCR Pre-смесь (VetPCR™) | 5,5 мкл | 5,5 мкл | 5,5 мкл | |
| внутренний контроль | | | | 5,5 мкл |
| вода свободная от РНК-аз | 6 мкл | 6 мкл | 6 мкл | 6 мкл |
| кДНК изолированная из образца | 2 мкл | | | 2 мкл |
| NDV положительный контроль | | 2 мкл | | |
| отрицательный контроль | | | 2 мкл | |
| минеральное масло (при необходимости) | 11 мкл | 11 мкл | 11 мкл | 11 мкл |

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

Таблица 4 – Программа для амплификации кДНК болезни Ньюкасла 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°С.

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов кДНК в агарозном геле.

6.7.4 Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

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

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

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

Вывернуть 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 кДНК.

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

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

6.7.5 Учет и интерпретация результатов

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной части кДНК вируса болезни Ньюкасла птиц. Длина амплифицированного специфического фрагмента кДНК вируса болезни Ньюкасла птиц должна быть 237 п.н., внутреннего контроля – 140 п.н.

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

6.8 Меры личной профилактики.

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

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

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

Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований по изучению культуральных свойств штаммов вируса ньюкаслской болезни 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
ньюкаслской болезни птиц**

Подписано в печать 02.03.2016.
Формат 60x90¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 0,93. Тираж 60 экз. Заказ № 136
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»

