

**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 » / декабря / 2016 г.
№ 4023/7

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, антигенных,
генетических свойств и инфекционной
активности производственных и эпизоотических
штаммов вируса репродуктивно-респираторного
синдрома свиней**

МИНСК 2016

Настоящие методические рекомендации по изучению культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных и эпизоотических штаммов репродуктивно-респираторного синдрома свиней подготовили:

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

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

Згировская А.А. – заведующая лабораторией биотехнологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кандидат биологических наук;

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

Красникова Е.Л. – научный сотрудник отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Рецензенты:

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

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

Репродуктивно-респираторный синдром свиней - синонимы «синее ухо», «голубой аборт», «энзоотический аборт свиней и респираторный синдром», «энзоотический поздний аборт свиней», «инфекционный поздний аборт свиней», «таинственная болезнь свиней»).

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) – вирусное заболевание, характеризуется поздними абортами у свиноматок (90–109 дней супоросности), преждевременными родами (110–112 дней), рождением мертвых, слабых, нежизнеспособных поросят, гибелью их в первые дни жизни, прохлостами свиноматок и поражением органов дыхания у поросят в послеродовый период.

Возбудитель заболевания – РНК-содержащий вирус, семейство *Arteriviridae*, род *Arterivirus*, , порядок *Nidovirales*.

На сегодняшний день известны два генотипа вируса PPCC: американский и европейский. Выделенные в европейских странах (Голландии, Испании, Италии, Германии, Дании) изоляты вируса PPCC по нуклеотидной и аминокислотной последовательности отнесены к европейскому генотипу. По литературным данным различают 3 группы европейского генотипа вируса PPCC: 1-я группа – западноевропейские, польские и часть российских изолятов; 2-я группа – чисто российские изоляты. Белорусские изоляты вируса PPCC имеют самостоятельную генетическую группу. По нуклеотидной последовательности белорусские изоляты вируса PPCC отличаются от западноевропейских на 17%.

Впервые заболевание установлено в 1986–1987 гг. в США и Канаде, в 90 годах выявлено практически во всех европейских странах с развитым свиноводством, за исключением Финляндии, Швеции и Ирландии. В 1991 году в Голландии выделен вирус PPCC под названием «Лелистад». Путем заражения поросят воспроизведено заболевание и доказана его вирусная природа. Имеются сообщения о том, что это заболевание имеет место в странах юго-восточной Азии – Японии, Китае, Корее, Таиланде, Малайзии и в европейских странах – Испании, Италии, Германии, Дании.

В России в 1991г. в одном из свиноводческих комплексов Курской области имело место заболевание, которое характеризовалось массовыми абортами у свиноматок, рождением мертвых, слабых, нежизнеспособных поросят, которые погибали в первые 3–5 дней после рождения. В 1993 году из патматериала от больных свиней в этом хозяйстве российскими учеными выделен изолят вируса PPCC, которому было дано название «Курский». В 1993 года заболевание выявлено в Республике Беларусь.

Широкое распространение PPCC во многих странах мира за последние 10 лет обусловлено возросшими экономическими связями между свиноводческими хозяйствами различных стран. Установлено, что вирус PPCC в благополучные фермы заносится с инфицированными свиньями. Особенно опасны в этом плане племенные хозяйства, неблагополучные по PPCC, ведущие продажу племенного молодняка. Из этих хозяйств вирус PPCC с племенными

животными разносится в благополучные хозяйства. Вирус РРСС передается от зараженных свиней к здоровым при их совместном содержании. Возможна также передача вируса РРСС через сперму. Возможен и аэрогенный путь заражения. Вирус сохраняется в воде до 11 суток. Из этого можно сделать заключение, что вода, используемая для поения свиней, может быть фактором распространения заболевания.

Вирус РРСС проникает в организм свиней алиментарным или аэрогенным путем, возможно его проникновение со спермой при осеменении свиноматок. У хряков-производителей, зараженных вирусом РРСС, вирус находится в спермоцитах, производящих сперматозоиды. В организме свиней вирус вступает во взаимосвязь с вирусспецифическими рецепторами, расположенными на поверхности чувствительных клеток верхних дыхательных путей, альвеолярных макрофагов, клеток лимфоидной ткани, проникая в них путем эндоцитоза. Через 6 часов после заражения вирус обнаруживается в цитоплазме макрофагов. Вирус РРСС, внедряясь в макрофаги, нарушает их функции и разрушает их. Уже через 3 часа после инфицирования отмечаются первые признаки дегенерации макрофагов. В результате снижается эффективность механизма перекисного окисления у макрофагов по уничтожению микробов. По этой причине снижается воздействие макрофагов на условно-патогенную микрофлору. Развитие респираторного синдрома у поросят, по-видимому, обусловлено активизацией вторичной бактериальной микрофлоры.

Репликация (удвоение) вирусной нуклеиновой кислоты и синтез белков происходит в цитоплазме клеток. Сборка и созревание вирусных частиц осуществляется в гладком эндоплазматическом ретикулуме. Сформировавшиеся вирионы накапливаются в везикулах эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. В результате этих сложных биохимических процессов уже через 12 часов в клетке формируются полноценные вирионы. Дочерние вирионы вируса освобождаются из клетки путем экзоцитоза или при лизисе макрофагов. Через 24 часа после заражения вирус проникает в кровь и разносится по всему организму в легкие, сердце, миндалины, печень, почки, селезенку, лимфатические узлы, головной мозг, тестикулы. В этот период наблюдается виремия. Продолжительность виремии составляет от 21–28 до 56 суток.

Механизм развития патологии супоросности при РРСС до конца не изучен. Известно, что вирус РРСС способен преодолевать трансплацентарный барьер и поражать плод, что приводит к развитию внутриутробной инфекции. На трансплацентарное проникновение вируса РРСС указывает обнаружение специфических антител к вирусу РРСС у мертворожденных плодов до приема молозива.

Мертворожденность, аборт или преждевременные роды у свиноматок развиваются в зависимости от сроков проникновения вируса в матку. Чаще нарушение репродуктивной функции имеет место у свиноматок, находящихся на третьем триместре (трети) супоросности. Возникают поздние аборт (90–109 дни супоросности) или преждевременные роды (110–

112 день супоросности) с рождением нежизнеспособных поросят, погибающих в первые дни жизни.

Одним из важных элементов патогенеза РРСС является длительная персистенция вируса в организме свиней. Научными исследованиями доказано длительное носительство и выделение вируса РРСС у свиней. В эксперименте вирус выделяли на 157 день после заражения поросят.

Заболевание РРСС у свиноматок отмечается обычно на 105–112 сутки супоросности. Сначала наблюдается отказ от корма, повышение или понижение температуры тела, через несколько дней – преждевременные роды. Количество мертворожденных поросят резко увеличивается, больные новорожденные поросята быстро теряют способность сосать и большинство их погибает в первую неделю жизни. Наибольшее количество новорожденных поросят и их гибель в первые дни жизни наблюдается в начальной стадии заболевания. Особенно это заметно на свиноводческих комплексах. Процент мертворожденности поросят в помете зависит от вирулентности вируса и срока супоросности, на котором свиноматка подверглась заражению. Мертворожденность поросят может составлять от 0 до 100%. Наблюдения показывают, что при повторных опоросах у переболевших свиноматок рождаются нормальные поросята. Однако после отъема среди таких поросят наблюдается высокий процент гибели от респираторных болезней.

Различают острое и хроническое течение болезни. Острый период болезни длится на ферме 3–4 месяца и прямо зависит от размеров фермы, условий и технологии содержания. В крупных свинокомплексах заболевание может длиться несколько лет, на небольших фермах – в течение нескольких месяцев. Отказ от корма наблюдается в начальной фазе заболевания. Лихорадка, отмечаемая в начальный период, регистрируется примерно у 30% поголовья свиноматок, при этом температура тела может повышаться до 41°C. Кроме того, отмечают цианоз ушей, вульвы, хвоста, брюшных стенок, пяточка. При хроническом течении болезни репродуктивная способность свиноматок постепенно возвращается к нормальной, однако продолжительное время отмечают снижение уровня рождаемости на 10–15% и респираторные симптомы у поросят. Необходимо отметить, что в некоторых свиноводческих хозяйствах при отсутствии клинических признаков болезни находили антитела к вирусу РРСС в сыворотках крови.

Патогистологические изменения при РРСС характеризуются интерстициальной пневмонией. Альвеолярные перегородки заметно утолщены вследствие инфильтрации макрофагами. Патологоанатомические изменения не являются патогномоничными, поскольку РРСС протекает в виде смешанной инфекции с другими вирусами и бактериями. Характер патологоанатомических изменений, выявляемых при вскрытии трупов животных, павших от РРСС, в определенной степени обусловлен наслоившейся условно-патогенной микрофлорой.

В РФ разработана сухая культуральная вирусвакцина против РРСС из аттенуированного штамма БД. Вакцина вводится внутримышечно поросятам

в 30–40-дневном возрасте, затем их через 2–3 месяца ревакцинируют. Ремонтных свинок прививают в 6–7-месячном возрасте, но не позднее чем за 2 месяца до осеменения. Иммуитет формируется через 14 дней после вакцинации, его продолжительность составляет не менее 4-х месяцев.

За рубежом, в частности в США, разработана живая вакцина против РРСС «Ingelvac MLV». В Европе (Германия, Франция, Нидерланды, Испания) разработаны и применяются живые и инактивированные вакцины. Применяется также инактивированная вакцина против РРСС производства НПО «НАРВАК» (Москва) и комбинированная вакцина против парвовирусной инфекции, лептоспироза, болезни Ауески и РРСС (ПЛАР).

Нужно отметить, что несмотря на определенную эффективность применяемых вакцин против РРСС с момента вакцинации до исчезновения клинических признаков болезни может пройти определенный период времени, занимающий несколько месяцев. Анализ результатов применения живой вакцины РРСС в Дании в течение 13 месяцев показал, что репродуктивные нарушения у свиноматок после начала вакцинации могут сохраняться до 7 месяцев и более.

1 ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВЕННЫМ И КОНТРОЛЬНЫМ ШТАММАМ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМОВ, ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК, ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН

1.1 Контрольные штаммы репродуктивно-респираторного синдрома свиней должны иметь характерные (в рамках семейства или рода) морфологические, биологические свойства, обладать генетически закрепленным уровнем вирулентности, инфекционной, антигенной и иммуногенной активности.

1.2 Штамм репродуктивно-респираторного синдрома свиней может культивироваться *in vitro* или в организме естественно восприимчивого животного, сохраняя фиксированные показатели вирулентных свойств в течение не менее 10 пассажей. Культивирование вируса в культуре клеток должно обеспечиваться отечественными или импортными средами и сывороткой крови, а также другими недефицитными материалами.

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

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

1.5 Для изготовления живых вакцин против репродуктивно-респираторного синдрома свиней используют штаммы вирусов, обладающие пониженной вирулентностью, умеренной реактогенностью, безвредностью и иммуногенностью для естественно восприимчивых животных всех возра-

тов, не способные к реверсии в вирулентное состояние.

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

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

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

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

1.10 Необходимые требования к штамму вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней:

Таблица 1 – Требования к штамму вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса в монослое клеток Marc-145	часы	60–120
2	оптимальная доза заражения,	ТЦД 50/ мл	0,5–0,8
3	объемная доза заражения	мл/ л поддерж.среды	40,0
4	оптимальное значение рН при репродукции	ед. рН	7,2–7,6
5	оптимальная температура размножения	град. С	36–37,5
6	титр инфекционности после репродукции в монослое клеток Marc-145	Lg ЭИД 50/ мл	4,5 и выше
7	стерильность	кол-во колоний в мл.	не допускается
8.	типоспецифичность	типсовая принадлежность в ПЦР	типоспецифичен

2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

Клетки предназначены для лабораторного культивирования вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней 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 тем-

пературе -196°С в течение 10 лет); при температуре 4°С хранится до 10 суток (жизнеспособность 90–95%).

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

Клетки должны быть свободны от контаминантов, количество которых контролируется посевами на селективные среды, окраской оливомицитином и акридином оранжевым (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика производственной линии культур клеток *Marc-145*.

№ п/п	Показатели	Единица измерения	<i>Marc-145</i> Допустимые параметры 5
	объем ампул, хранящихся в жидком азоте		75–80
2	концентрация клеток в размороженной ампуле	млн./мл	10–30
3	формирование монослоя	часы	48–60
4	кол-во клеток при культивировании в матрасах объемом: 100,0 мл; 250,0 мл; 500,0 мл; 1500,0 мл или в роллерах объемом 2,0 л; 3,0 л; 4,0 л	млн./мл	кол-во/ % живых 1,5–2,0/ 95–99% 2,0–2,8/ 95–99% 4,0–5,2/ 96–99% 10,0–12,0/ 96–99% 15,0–18,0/ 96–99% 18,0–22,0/ 96–99% 25,0–30,0/ 96–99%
5	индекс пролиферации		не менее 3
6	время удвоения популяции клеток	часы	16–24

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней используют следующие реактивы и оборудование:

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

- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020–0,20, 0,20–1,0 см³ по ТУ 64-16-55 или по другим действующим ТНПА;

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

- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30 см³ и до 1,0 см³ («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс (37±1,0)°С («Thermo», США или аналогичный других изготовителей);

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°С до плюс 8°С по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;

- CO₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO₂ и температуру нагрева плюс (37±1,0)°С (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- стаканы стеклянные вместимостью 50 см³ ГОСТ 25336;

- пипетки 1, 5, 10 см³ по ГОСТ 29227;

- флакон вместимостью 50 см³ по действующим ТНПА;

- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

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

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

- культура клеток Marc-145;

- 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 Marc-145, хранившиеся в жидком азоте (-196°С) в ампулах объемом 10–75 мл или в морозильнике при температуре -85°С, в пластиковых флаконах объемом от 100 до 500 мл. Ампулы или флаконы с суспензией клеток извлекают из хранилища, помещают в водяную баню с температурой 40°С и выдерживают до полного оттаивания.

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

2.3.2 Подсчет концентрации клеток.

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

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

X – количество клеток в 1 мл;

A – общее количество клеток в камере;

B – разведение суспензии.

Клетки используют для выращивания в монослое.

2.3.3. Выращивание клеток в монослое.

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

Клетки выращивают 48–72 ч при pH-7,0–7,4 и температуре 37°. Через 24 часа проводят смену питательной среды. Сформировавшийся монослой для проведения последующих пассажей снимают бесцентрифужным способом. Из матрасов удаляют ростовую среду, пласт клеток дважды ополаскивают смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1:9. Культуру укладывают пластом вверх, в таком положении она находится 10–15 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 100–250 мл матраса, т.е. пересев проводят с коэффициентом 1:2.

На следующем пассаже пересев осуществляют в 1,5 л матрас проводя все операции как описано выше. Таким образом, проводят ещё 2–3 пассажа каждый раз увеличивая количество матрасов в 2–3 раза, в течение которых клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства.

2.3.4 Криоконсервирование клеток

Для успешного криоконсервирования клеток Marc-145, выращенных в монослое, необходимо брать их в конечной стадии логарифмического роста. С монослоя клетки снимаются трипсин-версеном. Полученная суспензия должна иметь жизнеспособность не менее 95–100%. Для концентрирования и частичного освобождения суспензии от отработанной среды, ее центрифугируют при 1000 об/мин. К клеточному осадку добавляют свежей ростовой среды и доводят до нужной концентрации (20–35 млн. клеток в мл). В концентрат клеток добавляют 5–7% диметисульфоксида (ДМСО) или глицерина и сразу расфасовывают в ампулы, которые запаивают на кислородной горелке или полистироловые флаконы. Ампулы и флаконы маркируют и помещают в контейнеры. Экспозиция с криопротектором до начала замораживания не должна превышать двух часов.

Подготовленные контейнеры с ампулами размещают в камеру замораживания программного устройства или лабораторной установки и после этого начинают двухэтапное понижение температуры: на первом этапе до -30°C (1–2°C в мин); на втором этапе до 150°C (8–10 С 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 репродуктивно-респираторного синдрома свиней к культивированию

Материалом для заражения монослойных культур служат изучаемые или музейные штаммы вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней. С учётом титра вируса, указанного в паспортах, музейный вирус разво-

дят питательной средой для монослойного выращивания клеток из расчёта 0,5–0,8 ТЦД₅₀ 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°C. После указанной экспозиции инокулят сливают. Затем в матрасы вносят по 100–150 мл поддерживающее среды с антибиотиками: пенициллином, стрептомицином и левомецетином по 200 Ед каждого.

Инкубацию зараженных клеточных культур проводят при 37°C до поражения клеточного монослоя на 50–75% (ЦПД вируса проявляется при множественности инфицирования 40%) в течение 72–96 часов. После замораживания и оттаивания культуральную вирусосодержащую жидкость сливают в одну емкость, корректируют рН до 7,2–7,6 и расфасовывают в пенициллиновые флаконы по 10 мл, маркируют (этикетировать) и хранят при -40°C.

При освежении лиофилизированного вирусного материала его разводят питательной средой с рН 7,5–7,6 и выращивают в матрасах с монослойной культурой клеток Marc-145.

Второй и третий пассаж проводят аналогичным способом. После оттаивания вируса первого пассажа в водяной бане при 40°C им заражают монослойные культуры клеток Marc-145 по 10–15 мл на матрас или по 20 мл на роллер (доза заражения 0,5 ТЦД₅₀ на клетку). Клеточные культуры предварительно отмывают от ростовой среды. Адсорбцию проводят в течение 60 минут, после чего монослой клеток заливают питательной средой по 100–150 мл с рН 7,5–7,6. Инкубируют при 37°C до появления ЦПД на 75–90%. После замораживания-оттаивания и корректировки рН вирусосодержащую жидкость второго пассажа в необходимом количестве фасуют в пенициллиновые флаконы по 10 мл, а остальной вирусный материал – по 100–300 мл и хранят при -40°C.

2.3.6 Характерные изменения клеток под воздействием вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

ЦПД вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней может не проявляться при множественности инфицирования менее 40%.

Цитопатическое действие (ЦПД) вируса РРСС на культуру клеток Marc-145 проявляется в следующем: клетка округляется, то есть теряет поверхностные выступы (филлоподии и псевдоподии), и в конечной стадии наблюдается полный ее коллапс.

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

3.1 Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней определяют методом титрования в культуре клеток Marc-145.

3.2 Последовательные десятикратные разведения вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней от 10^{-1} до 10^{-8} готовят в 24-луночной планшете. Для этого в 8 лунок вносят по $0,9 \text{ см}^3$ питательной среды. Затем в первую лунку вносят $0,1 \text{ см}^3$ нативного вируса, получая его разведение 10^{-1} . Жидкость в первой лунке тщательно пипетируют дозатором и переносят $0,1 \text{ см}^3$ во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса 10^{-8} включительно.

Берут культуральный планшет с выращенным монослоем культуры клеток Marc-145 и удаляют из него ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку, переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем по $0,2 \text{ см}^3$ каждого разведения вируса, начиная с 10^{-8} , затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по $0,2 \text{ см}^3$ разведения вируса 10^{-7} и так далее до разведения 10^{-1} включительно.

В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и $0,2 \text{ см}^3$ поддерживающей среды).

Культуру клеток в планшетах инкубируют в CO_2 -инкубаторе при 5% 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 изменений в клетках. Характерно, что ЦПД вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней может не проявляться. Завершение титрации вируса проводят на шестой день инкубации. Учет результатов титрации вируса РРСС проводится под микроскопом после иммунопероксидазного окрашивания согласно инструкции, разработанной Национальной Референтной лабораторией отдела болезней свиней Государственного института ветеринарии в г. Пулавы (Польша).

Дополнительным контролем инфекционной активности вируса РРСС является определение наличия антигена вируса в культуральной жидкости с помощью ПЦР в режиме реального времени. Вирус предварительно титруют в культуральном планшете с монослоем клеток Marc-145 как описано выше. После шести суточной инкубации зараженных клеток планшет подвергают замораживанию при температуре -40°C и оттаиванию. Культуральную жидкость подвергают проверке в ПЦР. Учет результатов проводят сравнивая показатели оптической плотности опыта и контроля.

Инфекционная активность производственных штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней должна быть не выше, чем $4,5 \text{ lg TЦД}_{50/\text{мл}}$.

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

4.1 Специфичность штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней определяют в реакции нейтрализации со стандартными ги-

периммунными сыворотками.

4.2 Для изучения специфичности штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней используют следующие реактивы и оборудование:

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

- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020–0,20, 0,20–1,0 см³ по ТУ 64-16-55 или по другим действующим ТНПА;

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

- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30 см³ и до 1,0 см³ («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- секундомер по ГОСТ 577;

- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс (37±1,0)°С («Thermo», США или аналогичный других изготовителей);

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°С до плюс 8°С по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;

- шейкер для планшет FS-4 (при необходимости), («Labotek», Дания или других изготовителей);

- CO₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO₂ и температуру нагрева плюс (37±1,0)°С (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- пипетки 1, 5, 10 см³ по ГОСТ 29227;

- цилиндр мерный вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770;

- флакон вместимостью 50 см³ по действующим ТНПА;

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

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

- культуры клеток Mac-145 из банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;

- сыворотка гипериммунная против вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (IDEXX или Hipra);

- флюоресцирующий конъюгат против антигенов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней;

- иммунопероксидазный конъюгат против антигенов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

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

4.3.1 Реакцию ставят методом разведения вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁸ с по-

стоянной дозой гипериммунной сыворотки в разведении 1:10 и отрицательной (фетальной) сыворотки крупного рогатого скота в разведении 1:10. Последовательные десятикратные разведения вируса РРСС от 10^{-1} до 10^{-8} готовят в 24-луночной планшете. Для этого в 8 лунок вносят по $0,9 \text{ см}^3$ питательной среды. Затем в первую лунку вносят $0,1 \text{ см}^3$ нативного вируса, получая его разведение 10^{-1} . Жидкость в первой лунке тщательно пипетируют дозатором и переносят $0,1 \text{ см}^3$ во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса 10^{-8} включительно.

Затем в стерильный 24-луночный планшет в каждую лунку вносят по $0,5$ каждого разведения вируса и добавляют по $0,5 \text{ мл}$ гипериммунной сыворотки против РРСС 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_2 -инкубатор, где выдерживают при 5% CO_2 и температуре плюс $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ в течение 1 часа.

4.3.2 Берут культуральные планшеты с выращенным монослоем культуры клеток Macs-145 и удаляют из них ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку переносят в первые 4 лунки с клеточным монослоем по $0,2 \text{ см}^3$ смеси сыворотки в разведении 1:10 и вируса в разведении 10^{-1} . Затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по $0,2 \text{ см}^3$ смеси сыворотки 1:4 и вируса в разведении 10^{-2} и так далее до разведения 10^{-8} включительно.

Аналогично производят внесение на монослой отрицательной сыворотки с различными разведениями вируса.

4.3.3 В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и $0,2 \text{ см}^3$ поддерживающей среды);
- контроль вируса (по 4 лунки с культурой клеток, зараженных разведениями вируса 100 ТЦД₅₀);
- контроль гипериммунной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с $0,05 \text{ см}^3$ гипериммунной сыворотки и $0,15 \text{ см}^3$ среды);
- контроль отрицательной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с $0,05 \text{ см}^3$ отрицательной сыворотки и $0,15 \text{ см}^3$ среды).

Культуру клеток в пробирках инкубируют в CO_2 -инкубаторе при 5% CO_2 и температуре $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$.

Окончательный учет проводят на шестой день инкубации. Учет реакции проводят путем выявления специфического свечения в клетках при использовании флюоресцирующего конъюгата или коричневого окрашивания клеток с использованием иммунопероксидазного конъюгата.

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 lg.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

5.1 Антигенную активность штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней проводят путем изучения иммунного ответа у лабораторных животных после введения испытуемых вирусов.

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней используют следующие реактивы и оборудование:

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

- дозаторы пипеточные автоматические с диапазоном объема доз 0,020–0,20, 0,20–1,0 см³ по ТУ 64–16–55 или по другим действующим ТНПА;

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

- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30 см³ и до 1,0 см³ («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- секундомер по ГОСТ 577;

- термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс (37±1,0)°С («Thermo», США или аналогичный других изготовителей);

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°С до плюс 8°С по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;

- шейкер для планшет FS-4 (при необходимости), («Labotek», Дания или других изготовителей);

- CO₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO₂ и температуре нагрева плюс (37±1,0)°С (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- стаканы стеклянные вместимостью 50 см³ ГОСТ 25336;

- пипетки 1, 5, 10 см³ по ГОСТ 29227;

- цилиндр мерный вместимостью 100 см³ по ГОСТ 1770;

- флакон вместимостью 50 см³ 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 DMEM, («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520) или других изготовителей);

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

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

- культура клеток СПЭВ из банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;
- штамм вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней;
- клинически здоровые поросята живой массой по 15–18 кг, в крови которых отсутствуют антитела к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней – 8 голов;
- тест-система для выявления антител к вирусу РРСС в ИФА (фирма IDEXX).

5.3 Испытание проводят на четырех клинически здоровых поросятах живой массой по 15–18 кг, в крови которых отсутствуют антитела к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней, определяемые в ИФА. Исследуемый вирус, с инфекционным титром 4,5 lg ТЦД_{50/мл} в объеме по 3,0 см³ вводят двукратно с интервалом 21 день внутримышечно каждому из четырех поросят. Через 21 суток после вторичной иммунизации у всех животных берут кровь с целью получения проб сывороток согласно и последующего их исследования на наличие антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

5.4 Постановка ИФА производится в соответствии с Инструкцией по постановке ИФА для выявления антител к вирусу РРСС прилагаемой к тест-системе.

Вирус считают активным при условии, что индекс блокировки антител в сыворотках крови привитых поросят в ИФА должен быть не менее 0,4.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ (РРСС)

6.1 Генетическая идентичность и принадлежность штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней определяется с использованием полимеразной цепной реакции **в биологических пробах** с идентификацией продуктов амплификации в геле агарозы.

6.2 Для проведения генетической идентификации штаммов вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней используют следующие реактивы и оборудование:

- оборудование:
- ламинар;
 - твердотельный термостат «BIOSAN-CH100»(Латвия);
 - амплификатор «C 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США);
 - персональный компьютер (Windows XP, 2 GHz, 512 Mb RAM, 80 Gb HDD, CD-RW, USB 2.0, мышь);
 - микроцентрифуга высокоскоростная (14000 об/мин) Jouan (Франция);
 - вортекс «BIOSAN» (Латвия);
 - холодильник «Атлант МХМ 1841» (ЗАО «Атлант», РБ);

- система для электрофореза «Consort», (Бельгия);
- Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США);
- весы RADWAG AS 220/X (Польша);
- система подготовки чистой воды «Crystal В», ADRONA (Латвия);
- комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария), вместимостью 0,1–2 мкл, 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–10 мл;

***Оборудование приведено в справочном варианте и может использоваться любое оборудование с аналогичными характеристиками и спецификацией прибора.**

Лабораторная посуда:

- микропипетки типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5, 2,0 мл;
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler»;
- кюветы эмалированные 25x15 см²;
- ножницы остроконечные;
- пинцеты хирургические и анатомические;
- шприцы типа «Рекорд» ГОСТ 22967-97 – 1 мл и 5 мл;
- иглы инъекционные ГОСТ 25377-8;
- наконечники с фильтрами 100-1000 мкл;
- наконечники с фильтрами 5-200 мкл;
- наконечники с фильтрами 10мкл.

****Вся посуда для проведения ПЦР должна быть свободна от ДНК/и РНК.**

Химреактивы:

- набор реактивов для выделения общей РНК из образцов тканей и клеток с использованием неорганического сорбента («РНК – ВТК» ТУ ВУ 100185129.076);
- буфер для обратной транскрипции «Fermentas» (Литва, кат. номер EP0441);
- рибонуклеазный ингибитор (RiboLock) («Fermentas», Литва, кат. номер EO0381);
- обратная транскриптаза (RevertAid M-MuLV) («Fermentas», Литва, кат. номер EP0441);
- буфер для ПЦР (Buffer “AM” 10X) (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер R1 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер F1 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- праймер F2 (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- смесь дезоксинуклеотидов «Fermentas», Литва, кат. номер R0192;
- taq-полимераза (Tag DNA polymerase) Паспорт на продукцию (Праймтех);
- магния хлорид (Паспорт на продукцию (Праймтех));
- вода деионизированная ДНК очищенная;
- сахароза «Sigma», США, кат. номер B21361;

- агароза «Sigma», США, кат. номер A 4679;
 - бромкрезоловый красный «Sigma», США, кат. номер S0809;
 - физиологический раствор;
 - этидиум бромид «Sigma», США, кат. номер E 7637;
 - маркер (GeneRuler 50 bp DNA Ladder) «Fermentas», Литва, кат. номер SM0371;
 - раствор для электрофореза (Tris-EDTA Buffer 100x Concentrate «Sigma», США, кат. номер T9285);
 - вода дистиллированная ГОСТ 6709;
 - 3% хлорамин;
 - 5% перекись водорода;
- Дополнительно:
- вата;
 - перчатки;

6.3 Материал для исследования

- вирусодержащая суспензия, лиофильно высушенные образцы штамма вируса РРСС.
- пробы биологического материала от свиней (сперма, аборт, плоды, внутригрудная жидкость, смывы с носовой и ротовой полости, влагалищная слизь, кусочки паренхиматозных органов (легкие, лимфоузлы и т.п.), кровь, сыворотка).

6.4 ПЦР-анализ

Проводят в три этапа в отдельных комнатах (зонах) и руководствуются общими принципами описанными в **Методических указаниях по постановке полимеразной цепной реакции в ветеринарных диагностических лабораториях** Утв. ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/127).

Работу с химическими реактивами необходимо проводить с соблюдением правил техники безопасности. При случайном попадании на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть пораженное место большим количеством водопроводной воды.

Во время работы запрещается прием пищи, воды, курение.

Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.

На всех этапах анализа в первую очередь необходимо проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

Посуда для отбора биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромпиком, отмыта, простерилизована. Перед открыванием пробирок с биологическими жидкостями капли на крышках удалять центрифугированием. При открывании крышек избегать случайного касания внутренней поверхности крышек руками или инструментами.

На всех стадиях обработки биоматериала удаление надосадочной жидкости/осадка производить одноразовыми пластиковыми наконечниками с аэрозольным барьером и пипеткой полуавтоматической.

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

!!! За 30 минут до начала работы все растворы для выделения ДНК необходимо достать из холодильника и прогреть при комнатной температуре.

!!! Перед началом работы поместить раствор для ДНК (раствор 4) в твердотельный термостат при температуре 45°C.

6.4.1 Отбор и подготовка исследуемого биоматериала

- Тестируемые штаммы (вирусодержащая жидкость, лиофильно высушенные образцы) используют без разведения.

- Цельную кровь, отбирают из хвостовой вены, вены уха или синуса угла глаза в стерильные пробирки с 3%-ным раствором ЭДТА из расчета 1:10 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. Материал доставляют в лабораторию, не позднее, чем через три–шесть часов с момента забора материала, сохраняя при температуре от плюс 2°C до 8°C. Допускается однократное замораживание проб до исследования при температуре минус 8°C до минус 20°C. Для исследования достаточно 0,20 мл жидкости биоматериала.

При использовании в работе органов и тканей павших или вынужденно убитых животных (патматериал), кусочки органов измельчают ножницами и растирают в физиологическом растворе или по инструкции к набору реактивов для выделения общей РНК из образцов тканей и клеток с использованием неорганического сорбента «РНК–ВТК», ТУ ВУ 100185129.076-2007. Для исследования достаточно 0,2 мл суспензии биоматериала.

6.4.2 Типирование штаммов вируса РРСС

Используют праймеры синтезированные к области высококонсервативного гена белка (nucleocapsid protein) наружной оболочки вируса ограниченной рамками считывания ORF6-ORF7. Локализация нуклеотидной последовательности, кодирующей nucleocapsid protein в геноме вируса РРСС, соответствует позиции 14000–15000 нуклеотида (данные представлены по последовательности полного генома штаммов EF536003, JF748718, M96262 – номер в базе данных электронного ресурса NCBI).

6.4.3 Порядок проведения исследований

ПЦР-анализ проводят в три этапа в отдельных комнатах (зонах).

6.4.3.1 Этап 1 (зона 1)

Выделение РНК из исследуемого материала проводят набором реактивов для выделения общей РНК из образцов тканей и клеток с использованием неорганического сорбента («РНК – ВТК»).

Для выделения РНК взять определенное количество (2+N) микропробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 мл (N – число исследуемых образцов) маркировать арабскими цифрами, включая ОКО и ПКО. В маркированные пробирки полуавтоматической пипеткой внести по 0,40 мл раствора денатурирующего и по 0,10 мл исследуемых образцов, ПКО и ОКО. Затем содержимое пробирок перемешать на вортексе, добавить в каждую пробирку по 0,10 мл суспензии сорбента неорганического (0,050 г сорбента в 1,3 мл рас-

твора денатурирующего), и снова перемешать смесь. Инкубировать смесь при комнатной температуре (18–25)°С в течение двух мин, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение одной мин.

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

Колонки перенести в новые маркированные пробирки, добавить по 0,05 мл элюирующего раствора, инкубировать в твердотельном термостате в течение трех мин, при температуре плюс 45°С, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин в течение двух мин. Полученный раствор, содержащий тотальную РНК, использовать во втором этапе (зона 2).

6.4.3.2 Этап 2 (зона 2) Обратная транскрипция и амплификация

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

Обратная транскрипция

Расчитать необходимое количество реакционной смеси с учетом расхода на одну пробу. Отобрать необходимое количество микропробирок. Приготовить (на льду) необходимое количество реакционной смеси. Для проведения нескольких (N) реакций приготовить ОТ-смесь содержащую в 20 мкл реакционной смеси: 4 мкл буфера для ревертазы, 1,6 мкл 10 mM dNTP mix, 400nM обратного праймера с концентрацией 20 пмоль/мкл, 0,7 мкл ревертазы, 0,5 мкл рибонуклеазного ингибитора добавить до 10 мкл воды DNA/RNA free очищенной и 10 мкл выделенной РНК. После пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек. Центрифугировать на вортексе при 2 тыс. об/мин в течение 1–3 сек. Пробирки выдержать в термостате при температуре плюс 42°С в течение 1 ч, после чего 10 мин при температуре плюс 72°С, затем центрифугировать при 13 тыс. об/мин. в течение 1–3 сек.

Амплификация

- Для проведения амплификации следует отобрать необходимое количество микропробирок, приготовить (на льду) 50мкл реакционной смеси в: 5 мкл буфера для Таq-ДНК полимеразы, 1,25 10 mM dNTP mix – смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 500 nM каждого праймера с концентрацией 20 пмоль/мкл, 3мМ хлорида магния, 2,5 ед. активности термостабильной Таq

ДНК-полимеразы, довести объем до 45 мкл водой DNA/RNA free очищенной.

- Подписать пробирки в соответствии с их первоначальными обозначениями.

- Внести по 0,045 мл верхней смеси в каждую пробирку с запечатанной парафином с реакционной смесью.

- Внести 0,005 мл полученного раствора ДНК (ОКО, ПКО)

- Пипеткой полуавтоматической наложить 0,020 мл масла минерального (приблизительно одна капля из наконечника на 0,20 мл).

- Пробирки с подготовленной смесью центрифугировать при 12 тыс. об/мин в течение 3–5 с.

- Поместить пробирки в амплификатор и провести амплификацию согласно инструкции по применению амплификатора. Амплификацию проводить в соответствии с программой:

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): С 1000 Thermal Cycler, Терцик (ДНК-технология), PalmCycler (Corbett Research)		Кол-во повторов
Температура	Время	
95°C	5 мин	1
94°C	30сек	35
55°C	30сек	
72°C	30сек	
72°C	5 мин	–
12°C	хранение	–

6.4.3.3 ЭТАП 3(зона 3) электрофорез

На третьем этапе провести электрофоретический анализ продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1 Для приготовления рабочего электрофорезного буфера к 990 мл воды дистиллированной добавить 10,0 мл раствора для электрофореза и 0,04 мл бромистого этидия.

ВНИМАНИЕ! При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

2 Приготовить 2% агарозный гель путем внесения в стеклянную колбу из термостойкого стекла 1,0 г агарозы и 50,0 мл электрофорезного буфера. Нагреть колбу со взвесью агарозы в микроволновой печи до полного растворения агарозы (примерно 1–1,5 минуты при мощности 700 Вт).

3 На горизонтальный столик для заливки гелей поместить форму, залить расплавленной агарозой и установить гребенку. Толщина геля должна быть не более 0,5 см.

4 После полного застывания геля (30 минут при комнатной температуре) осторожно вынуть гребенку. Форму поместить в электрофоретическую камеру, расположив лунками к отрицательному электроду. В камеру залить

готовый буфер из расчета, чтобы он покрывал гель приблизительно на 1–5 мм сверху.

5 Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив, внести 0,01–0,015 мл пробы в лунки геля.

В первую лунку геля необходимо внести ДНК маркер (5 мкл), во вторую – ОКО, третью – ПКО.

6 Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить напряжение. Электрофорез проводить при напряжении 12,0 В/см геля в течение 30 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 120 В).

7 По завершении электрофореза, выключить источник тока.

8 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины и поместить на экран трансиллюминатора. Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор.

6.4.3.4 Учет результатов

Проба с ПКО должна быть видна в ультрафиолетовом свете при длине волны равной 254 нм или 310 нм в виде светящейся полосы соответствующей маркеру на уровне 274 п.н. красно-оранжевого цвета (рисунок 1, К+), а с ОКО – должна отсутствовать светящаяся полоса (рисунок А.1, проба ОТ-). Положительным результатом исследуемого образца на геле считается полоса ДНК, наблюдаемая на уровне видимой полосы ПКО, при отсутствии таковой в ОКО (рисунок 1, проба К-) (дорожка на геле пустая).

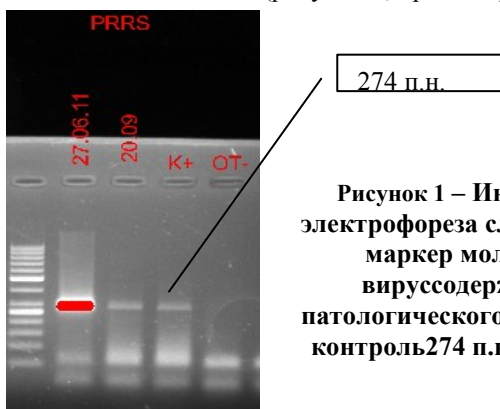


Рисунок 1 – Интерпретация результатов электрофореза слева направо соответственно маркер молекулярного веса, проба вирусосодержащей суспензии, проба патологического материала, положительный контроль 274 п.н., отрицательный контроль

Результаты положительных контрольных образцов должны укладываться в указанный в инструкции диапазон. Если полученные значения не укладываются в заданный диапазон, то это свидетельствует о неэффективном выделении РНК, неверно приготовленной ПЦР-смеси, а также других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа.

Нормативное производственно-практическое издание

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
по изучению культуральных, антигенных,
генетических свойств и инфекционной
активности производственных и эпизоотических
штаммов вируса репродуктивно-респираторного
синдрома свиней**

Подписано в печать 02.03.2016.
Формат 60x90 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 1,16. Тираж 60 экз. Заказ № 139.
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»

