

**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
парвовируса свиней**

МИНСК 2016

Настоящие методические рекомендации по изучению культуральных, инфекционных, антигенных и генетических свойств производственных и эпизоотических штаммов парвовируса 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;

Зириковская 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

Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) – вирусное заболевание, которое характеризуется нарушением репродуктивной функции у свиноматок, которое клинически проявляется у супоросных свиноматок рождением малоплодных пометов, мумифицированных плодов, мертвых и слабых поросят, гибелью эмбрионов и плодов, прохолостами. В других возрастных группах свиней болезнь протекает латентно.

Возбудитель заболевания – парвовирус семейства *Parvoviridae*, род *Parvovirus*. ДНК-содержащий, безоболочечный вирус не содержит липидов. Вирионы мелкие (*parvus* – маленький) размером в диаметре 18–22 нм.

Парвовирус устойчив к воздействию эфира, хлороформа, трипсина, фреона-113, дезоксихолата, этилового спирта. Не теряет инфекционность при pH от 3,0 до 9,0, в условиях термостата при температуре 37°C в течение 90 мин, однако инактивируется при pH ниже 2,0. Инактивируется ультрафиолетовыми лучами, ультразвуком, формалином, диэтиленгликолем.

Парвовирус культивируется в свиных клеточных культурах, проявляя цитопатогенное действие, которое характеризуется округлением и дегенерацией клеток, зернистостью цитоплазмы, отслоением от стекла. Парвовирус агглютинирует эритроциты морской свинки, крысы, мыши, обезьяны, человека, но не агглютинирует эритроциты свиньи, лошади, крупного рогатого скота, кур. Отличительной особенностью парвовируса является то, что он хорошо размножается в молодых, делящихся клетках в период их логарифмического роста, когда большинство клеток находятся в S-фазе митоза.

Парвовирусная инфекция свиней относится к группе инфекционных заболеваний, для которых характерна длительная персистенция возбудителя в организме животных. Она широко распространена во многих странах мира с развитым свиноводством. Источником возбудителя заболевания являются больные и переболевшие свиноматки, выделяющие парвовирус с абортрованными, мертворожденными плодами, фекалиями, плацентой, носовыми и вагинальными выделениями. Заражение происходит трансплацентарно, пероральным, половым и аэрогенным путем. Парвовирус обнаружен также в сперме больных хряков-производителей, что не исключает заражения животных при осеменении или случке. Вирус выделяется с фекалиями до 2-х недель и сохраняет инфекционность до 135-140 дней т.е. парвовирус достаточно устойчив во внешней среде и не исключена вероятность его заноса механически. Занесенный в благополучное хозяйство вирус в течение 2–3-х месяцев способен поразить все свинополовье.

Заражение свиней парвовирусом происходит алиментарным или аэрогенным путем. Проникнув в организм, парвовирус локализуется в лимфоидной ткани – лейкоцитах, моноцитах, не повреждая и не нарушая их функций. В оплодотворенные яйцеклетки и ранние эмбрионы (9-12 дней), содержащие прозрачную оболочку, парвовирус не проникает. Инфицирование

происходит, по-видимому, после удаления прозрачной оболочки и имплантации зиготы в слизистую оболочку матки. Передача вируса от одного плода к другому происходит медленно, поэтому плоды заражаются на разных стадиях развития. В этой связи можно наблюдать рождение мумифицированных плодов, мертвых, слабых и нормальных поросят. Если свиноматки заражены на ранней стадии супоросности (до 36 дней), то наблюдается рассасывание эмбрионов. Свиноматки опять приходят в охоту. При инфицировании свиноматок на 36–70 день супоросности отмечают мумификацию плодов, возможны аборт. Заражение свиноматок парвовирусом на более поздних стадиях (после 70 дней супоросности) приводит к рождению иммунокомпетентных поросят, которые пожизненно могут оставаться вирусоносителями и представлять опасность как источник парвовирусной инфекции при завозе их в благополучные хозяйства.

У супоросных свиноматок, больных ПВИС, наблюдается мертворождаемость на ранней стадии супоросности, мумификация плодов, повторный приход в охоту после осеменения, бесплодие, уменьшение числа поросят в помете, реже аборт. У хряков-производителей, холостых свиноматок болезнь протекает без заметных клинических симптомов. У инфицированных парвовирусом поросят отмечают угнетение, отказ от корма, рвоту, диарею, незначительное повышение температуры тела.

Специфическая профилактика заболевания у свиней основана на применении живых и инактивированных вакцин.

В России разработаны инактивированные эмульгированные вакцины против парвовирусной инфекции свиней из штаммов «К-82» и «И-82». Основных свиноматок прививают внутримышечно, однократно за 2 недели до отъема поросят, затем после их отъема, в дозе 3,0 см³. Ремонтных свинок прививают за 3–4 недели до осеменения. Хряков-производителей прививают в 6–7-месячном возрасте, затем ревакцинируют через каждые 6 месяцев. Иммунитет наступает через 15 дней после вакцинации и сохраняется в течение 6 месяцев. Кроме того, в РФ разработана вакцина эмульсионная инактивированная против парвовирусной инфекции свиней (ПВИС). Основных свиноматок, разовых свинок прививают двукратно с интервалом в 20–30 суток за 3 недели до осеменения. В последующем ранее иммунизированных свиноматок прививают однократно за 3 недели до случки. Поросят прививают в возрасте 1,5–2 месяца двукратно с интервалом в 20–30 дней. Вакцину вводят в дозе 1,0 см³ независимо от возраста свиней. Иммунитет формируется через 21 сутки после введения вакцины и сохраняется в течение 6 месяцев.

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

1.1 Контрольные штаммы парвовируса 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 парвовируса свиней может культивироваться *in vitro* на культуре клеток 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 питательными средами и сывороткой крови, а также другими 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 $0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ в течение 12 месяцев).

1.5 Для изготовления вакцин против парвовируса свиней 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* на 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 парвовирусу свиней:

Таблица 1 – Требования к парвовирусу свиней

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса в монослое клеток РК-15	часы	72–96
2	оптимальная доза заражения	ТЦД _{50/мл}	0,2–1,0
3	объемная доза заражения	мл/ л поддерж. среды	40,0
4	оптимальное значение pH при репродукции	ед. pH	7,2–7,6
5	оптимальная температура размножения	град. С	36–37,5
6	титр гемагглютинации после репродукции в монослое клеток РК-15 в РГА, не менее	1/n (log ₂)	1:128 – 1:256 (7–8 log ₂)
7	стерильность	кол-во колоний в мл.	не допускается
8	типоспецифичность	типовая принадлежность в ПЦР	типоспецифичен

2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ПАРВОВИРУСА СВИНЕЙ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования парвовируса свиней:

Клетки предназначены для лабораторного культивирования парвовируса свиней с целью изучения морфологических свойств вируса должны и характеризоваться высокой пролиферативной активностью (индекс пролиферации от 3,0 до 4,0), а также чувствительностью к вышеуказанному вирусу. Популяции клеток должны обладать устойчивостью к криоконсервированию (жизнеспособность 95–99% при температуре -196°С в течение 10 лет); при 4°С хранится до 10 суток (жизнеспособность 90–95%).

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

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

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов парвовируса 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 изгото-

вителей);

- 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)°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;

- CO₂-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при: 5% CO₂ и температуру нагрева плюс (37±1,0)°C (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 Игла МЕМ («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;

- среда 199 («Sigma», США (номер продукта M0393)) или других изготовителей;

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

- культура клеток РК-15, SK-6, депонированные в коллекции микроорганизмов и культур клеток РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;

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

2.3 Выращивание клеток в монослое.

2.3.1 Реконсервирование клеток.

Для культивирования используют клетки РК-15, SK-6, хранившиеся в жидком азоте (-196°C) в ампулах объемом 10–75 мл или в морозильнике при температуре -85°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°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 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 РК-15, SK-6, 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 центрифугирования 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% диметилсульфоксида 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 ($1-2^{\circ}\text{C}$ в мин); на втором этапе до 150°C ($8-10^{\circ}\text{C}$ в мин); далее объект переносят в жидкий азот на длительное хранение.

После переноса контейнеров с ампулами в жидкий азот необходимо, чтобы при испарении жидкой фазы ампулы не находились при более высокой температуре. В жидком азоте клетки могут храниться без изменения жизнеспособности более 10 лет.

2.3.5 Подготовка штаммов парвовируса свиней к культивированию.

Материалом для заражения монослойных культур служат изучаемые или музейные штаммы парвовируса свиней. С учётом титра вируса, указанного в паспортах, музейный вирус разводят 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 монослоем клеток $30-50\%$ без смены среды.

Инкубацию зараженных клеточных культур проводят при температуре 37°C до специфического поражения монослоя (ЦПД) на 50% в течение 72 часов. После замораживания и оттаивания культуральную вирусосодержащую жидкость сливают в одну емкость, корректируют pH до $7,2-7,6$ и фасуют в пенициллиновые флаконы по 10 мл, маркируют (этикетировать) и хранят при -40°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 PK-15, SK-6.

Второй и третий пассаж проводят аналогичным способом. После оттаивания вируса первого пассажа в водяной бане при 40°C им заражают монослойные культуры клеток PK-15, SK-6 по 10 мл на матрас по методике описанной выше.

Инкубируют при 37°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 -40°C .

2.3.6 Характерные изменения клеток под воздействием парвовируса:

ЦПД парвовируса проявляется не ранее, чем через 72 часа и характеризуется округлением клеток, зернистостью расположением их кучками в виде пауков.

3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПАРВОВИРУСА СВИНЕЙ

3.1 Гемагглютинирующую активность производственных или эпизоотических штаммов парвовируса свиней определяют в реакции гемагглютинации (РГА).

3.2 Для постановки РГА используют пластиковые 96-луночные планшеты с круглым дном. Допускается повторное использование планшетов тщательно отмытых и обработанных 70% ректификованным спиртом. Вначале готовят двукратные разведения вируса. Для этого во все лунки планшета вносят по $0,05 \text{ см}^3$ физиологического раствора. В первую лунку добавляют $0,05 \text{ см}^3$ парвовируса, трехкратно пипетируют и переносят $0,05 \text{ см}^3$ во вторую лунку и так далее до разведения 1:2048. Затем во все лунки вносят по $0,05 \text{ см}^3$ 0,6%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. Планшет встряхивают и выдерживают при температуре 4°C в течение 2–3 часов. За титр вируса принимают его наибольшее разведение, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов.

Для контроля эритроцитов на отсутствие спонтанной агглютинации и определения времени учета реакции в две лунки планшета с $0,05 \text{ см}^3$ физиологического раствора добавляют $0,05 \text{ см}^3$ 0,6%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. Реакцию учитывают при полном оседании эритроцитов в контрольных лунках.

Гемагглютинирующая активность парвовируса должна быть не ниже, чем $7-8 \log_2$ (разведения 1:128–1:256).

4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ПАРВОВИРУСА СВИНЕЙ

4.1 Специфичность штаммов парвовируса свиней определяют в полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

4.2 ПЦР ставят согласно инструкции по применению тест-системы для определения парвовируса в биологическом материале.

5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ПАРВОВИРУСА СВИНЕЙ

5.1 Антигенную активность штаммов парвовируса свиней проводят путем изучения иммунного ответа у поросят после введения испытуемых вирусов.

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов парвовируса свиней используют следующие реактивы и оборудование:

- 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);

- холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2°С до плюс 8°С по ГОСТ 26678 или по другим действующим ТНПА;
- 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;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор стерильный физиологический с массовой долей 0,85% (рН 7,2-7,4);
- штамм парвовируса свиней;
- клинически здоровые поросята в возрасте 1–2 месяца – 4 головы;
- набор для диагностики парвовирусной болезни свиней в реакции гемагглютинации и реакции торможения гемагглютинации (организация-производитель – ЗАО «НПА Нарвак», г. Москва).

5.3 Испытание проводят на четырех клинически здоровых поросятах в возрасте 1–2 месяца. Двум поросятам с помощью одноразового шприца и одноразовой иглы вводят внутримышечно двукратно с интервалом 14 суток пробу вируса по 2,0 см³. Два поросенка оставляют в качестве контроля не вакцинированными.

Через 14 суток после второй иммунизации у всех животных берут кровь для получения проб сывороток.

Сыворотки крови перед постановкой реакции разводят в 16 раз фосфатно-буферным раствором и инактивируют в водяной бане при (56±1)°С в течение 30 минут. Для адсорбции неспецифических гемагглютининов добавляют каолин (25% раствор в ФБР) в соотношении 1:1 и сенсибилизируют эритроцитами морской свинки.

5.4 Постановка реакции РТГА.

В лунки планшета вносят по 0,05 см³ фосфатно-буферного раствора. В первый ряд вносят по 0,05 см³ обработанных сывороток. Готовят двукратные разведения проб. В каждую лунку добавляют по 0,05 см³ антигена в рабочем разведении (8ГАЕ) и выдерживают 1 час при температуре (20±2)°С. Затем в каждую лунку вносят по 0,05 см³ 0,6% суспензии эритроцитов морской свинки, планшет встряхивают и выдерживают 2–3 часа при температуре (6±2)°С. В реакции ставят контроли:

- контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию;
- контроль рабочей дозы антигена;
- контроль специфичности антигена с гипериммунной и нормальной сыворотками.

За титр антител принимают предельное разведение сыворотки, полностью подавляющее гемагглютинирующую активность антигена в рабочем разведении. Пробу считают положительной при обнаружении антигеммагглютинирующих антител в сыворотке крови поросят в титре 1:64 и вы-

ше.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ ПАРВОВИРУСА СВИНЕЙ

6.1 Генетическая идентичность и принадлежность штаммов возбудителя парвовирусной болезни свиней определяется с использованием полимеразной цепной реакции в биологических пробах с идентификацией продуктов амплификации в геле агарозы.

6.2 Для проведения генетической идентификации штаммов возбудителя парвовирусной болезни свиней используют следующие реактивы и оборудование:

оборудование:

- ламинар;
- твердотельный термостат «BIOSAN-CH100»(Латвия);
- амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США);
- персональный компьютер (Windows XP, 2 GHz, 512 Mb RAM, 80 Gb HDD, CD-RW, USB 2.0, мышь);
- микроцентрифуга высокоскоростная (14 000 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:

- микропробирки 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 25×15 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 ДНК из образцов ткани и клеток с использованием неорганического сорбента «ДНК – ВК», ТУ ВУ 100185129.099 или аналогичного;

- буфер для ПЦР (Buffer «АМ» 10X) (Паспорт на продукцию (Праймтех));

- магния хлорид (Паспорт на продукцию (Праймтех));

- taq-полимераза (Tag DNA *polymerase*) (Паспорт на продукцию (Праймтех));

- праймеры F (Паспорт на продукцию (Праймтех));

- праймеры R(Паспорт на продукцию (Праймтех));

- смесь дезоксинуклеотидов«Fermentas», Литва, кат. номер R0192;

-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% хлорамины;

- 5% перекись водорода;

Дополнительно:

- вата;

- перчатки;

6.3 Материал для исследования.

- вирусодержащая суспензия, лиофильно высушенные образцы штамма возбудителя парвовирусной болезни свиней;

- пробы биологического материала от свиней (голову или головной мозг, кусочки паренхиматозных органов (от свиней обязательно из легких) и лимфоузлы, 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 70°C.

6.4.1 Отбор и подготовка исследуемого биоматериала.

- тестируемые штаммы (вируссодержащая 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. Для исследования достаточно 0,2 мл суспензии биоматериала.

6.4.2 Типирование штаммов возбудителя парвовирусной болезни свиней

Используют праймеры синтезированные к области генома кодирующей неструктурный белок NS1 и фланкирующие участок 31–2019 (данные представлены по последовательности *Porcine parvovirus* NADL – 2 M123

complete genome KF9113351.1 номер в базе данных электронного ресурса NCBI).

6.4.3 Порядок проведения исследований.

6.4.3.1 ЭТАП 1 (зона № 1) Выделение ДНК из исследуемого материала.

1 Для выделения ДНК взять определенное количество (n+2) микропробирок типа эппендорф вместимостью 1,5 мл (n – число исследуемых образцов) маркировать арабскими цифрами, включая ОКО и ПКО. Все пробирки необходимо маркировать надписями «S1», «S2», «S12».

2 В каждую пробирку пипеткой полуавтоматической (для каждой пробы должен использоваться отдельный стерильный наконечник с аэрозольным барьером) внести по 0,5 мл раствора №1 (лизирующего раствора), и 0,1 мл исследуемого образца, включая ОКО и ПКО. Все образцы интенсивно перемешать на вортексе в течение 7–10 минут при комнатной температуре (18–25)°С, затем нанести их на колонку и центрифугировать одну минуту при 12 тыс. об./мин.

3 Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической и отдельного наконечника с аэрозольным барьером.

4 Добавить 0,50 мл промывочного раствора 1 (раствора 2) и центрифугировать при 12 тыс. об/мин в течение одной мин. Осадочную жидкость удалить пипеткой полуавтоматической и отдельного наконечника с аэрозольным барьером.

5 Добавить 0,50 мл промывочного раствора 2 (раствора 3) и центрифугировать при 12 тыс. об/мин в течение двух мин.

6 Колонки перенести в новые пробирки, добавить по 0,2 мл раствора для ДНК (раствора 4), затем центрифугировать при 12 тыс. об/мин в течение двух мин.

!!! Полученный раствор, содержащий тотальную ДНК, используют во втором этапе.

6.4.3.2 ЭТАП 2 (зона 2), амплификация В отдельной пробирке для

Наименование реагента	Объем,
буфер для ПЦР (Buffer «АМ» 10X) мкл	5×N
магния хлорид (50 мМ) мМ	1×N
10 mM dNTP mix – смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов мкл	1,5×N
каждого праймера с концентрацией 20 пмоль/мкл	300nM×N
раствор для полимеразной цепной реакции, мкл	10×N
таq-полимераза ЕД	2,5×N
вода ДНК очищенная	до 45×N

Примечание – N – число проб

Пробирки с подготовленной смесью центрифугировать на вортексе при 2 тыс. об/мин в течение 1–3 с. Не допускать образование пузырьков во время проведения теста.

1 Подписать пробирки в соответствии с их первоначальными обозначениями.

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

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

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

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

6 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): C 1000 Thermal Cycler, Терцик (ДНК-технология), PalmCycler (Corbett Research)		Кол-во повторов
температура	время	
95°C	5 мин	1
94°C	45сек	35
60°C	30сек	
72°C	15сек	
72°C	10 мин	–
10°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 271 п.н. красно-оранжевого цвета (рисунок А.1, К+), а с ОКО – должна отсутствовать светящаяся полоса (рисунок А.1, проба К-). Положительным результатом исследуемого образца на геле считается полоса ДНК, наблюдаемая на уровне видимой полосы ПКО (рисунка А.1, проба 1–6), при отсутствии таковой в ОКО (рисунок А.1, проба К-) (дорожка на геле пустая).

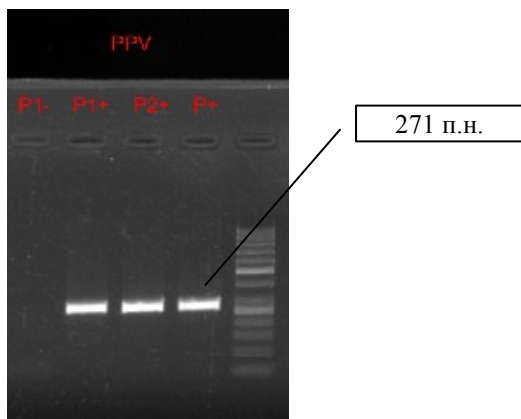


Рисунок 1 – Интерпретация результатов электрофореза (P1, P2 – пробы патологического материала P+ положительный контроль 271 п.н., P – отрицательный контрольный образец

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований по изучению культуральных свойств штаммов парвовируса свиней на перевиваемых клетках, определению его инфекционной активности, видовой принадлежности, специфичности и генетической идентичности позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать штаммы вируса и использовать их биотехнологическом производстве биопрепаратов и диагностических тест-систем.

Нормативное производственно-практическое издание

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

Подписано в печать 02.03.2016.
Формат 60х90 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 0,93. Тираж 60 экз. Заказ № 144.
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»

