

**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» февраля 2016 г.



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

МИНСК 2016

Настоящие методические рекомендации по изучению культуральных, антигенных и генетических свойств и инфекционной активности производственных и эпизоотических штаммов ротавируса 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;

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

**Красочко И.А.** – ведущий научный сотрудник отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.С.Н. Вышелесского», доктор ветеринарных наук, профессор;

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

#### **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

**Ротавирусная болезнь свиней** (ротавирусная инфекция, ротавирусная диарея) – инфекционное вирусное заболевание свиней, которое клинически проявляется гастроэнтеритом. Зарегистрировано в странах с развитым промышленным свиноводством.

Ротавирус свиней – РНК-содержащий вирус семейства *Rotaviridae*, рода *Rotavirus*, вид *Porcine rotavirus of swine*. Под электронным микроскопом ротавирусные вирионы напоминают по форме колесо с ободом и спицами (рисунок 3.3). Ротавирус содержит две белковые оболочки – наружный и внутренний капсиды. Наружный капсид напоминает обод колеса, внутренний капсид – спицы колеса. По этим морфологическим признакам эти вирусные частицы стали называть ротавирусами (лат. «*rota*» – колесо). Размер вирусных частиц – 70–75 нм.

Установлено, что все известные ротавирусы животных и человека имеют общий групповой антиген, который расположен во внутреннем капсиде вириона. Однако ротавирусы различных видов животных и человека имеют свой видоспецифический антиген, который расположен во внешнем капсиде ротавируса.

Этиологическая роль ротавирусов в возникновении гастроэнтеритов свиней доказана работами многих исследователей в различных странах мира. В России Орлянкин Б.Г. с соавт., 1980 г. доказал, что ротавирусы являются этиологическими агентами острых гастроэнтеритов поросят, телят, ягнят, жеребят, собак, кошек, кроликов, обезьян, детей и считает возможным в эксперименте вызвать заражение одного вида животных ротавирусом другого вида.

Эпизоотологические особенности ротавирусной болезни свиней существенно не отличаются от таковых при трансмиссивном гастроэнтерите свиней. Ротавирус выделяется во внешнюю среду с фекалиями (до  $10^{10}$  ротавирусных частиц в 1 г фекалий). Заражение происходит алиментарным путем. Передача возбудителя происходит путем прямого контакта больных поросят со здоровыми, а также через инфицированные корма, обслуживающий персонал, инвентарь, транспорт и т.д. Наиболее чувствительными к ротавирусу свиней являются поросята в возрасте 7–41 дня после рождения. Заболевают также поросята в первую неделю после отъема. Заболеваемость их составляет 50–80%, летальность – до 50%. Сопутствующие болезни (колибактериоз, трансмиссивный гастроэнтерит) осложняют течение ротавирусной болезни и приводят к более высокой летальности – до 80–90%. Взрослые свиньи могут заражаться и переболеть без проявления клинических признаков гастроэнтерита, но они опасны тем, что выделяют во внешнюю среду большое количество ротавируса, который передается молодняку свиней и вызывает заболевание. Чаще всего ротавирусную болезнь обнаруживают у поросят в возрасте 21–41 день и преимущественно у поросят, по-

лученных от свиноматок-первоопоросок. Поддерживают в стаде ротавирусную инфекцию переболевшие поросята, так как они остаются долгое время вирусоносителями и вирусовыделителями, а также взрослые свиньи, которые переболели ротавирусной инфекцией бессимптомно.

Ротавирусная болезнь протекает чаще всего в виде энзоотии. По результатам наших исследований в 1970–1980 гг. ротавирусная болезнь зарегистрирована в 69,4% случаев вспышек острых желудочно-кишечных заболеваний поросят. Инфекция имеет тенденцию к стационарности. Однажды возникнув в хозяйстве, заболевание регистрируется в течение ряда лет, обостряясь в осенне-зимний периоды и угасая к лету. На течение болезни существенное влияние оказывает возраст поросят при их отъеме от свиноматок. Ранний отъем поросят способствует развитию болезни. Поросята, отнятые в двухнедельном возрасте, заболели ротавирусным гастроэнтеритом в 66,2% случаев, отнятые в возрасте 4–5 недель – в 24,1% случаев.

В основе патогенеза при заражении поросят ротавирусом лежат те же процессы, что и при заражении вирусом ТГС. Ротавирус свиней проникает в цилиндрические эпителиальные клетки, выстилающие ворсинки слизистой оболочки тонкого кишечника, где происходит его репликация. Через 16–18 часов после проникновения ротавируса в клетки цилиндрического эпителия значительная их часть разрушается и отторгается от слизистой оболочки тонкого отдела кишечника, что совпадает с появлением гастроэнтерита у зараженных животных. Отторгнутый цилиндрический эпителий замещается кубическим эпителием, в котором ротавирус не размножается. В результате разрушения цилиндрического эпителия нарушаются процессы всасывания питательных веществ и пищеварения, происходит наслоение условно-патогенной микрофлоры (кишечная палочка, кокки, шигелла и др.). Нарушается равновесие полезной и условно-патогенной микрофлоры за счет уменьшения количества молочнокислых и других полезных для организма микроорганизмов и увеличения числа гнилостной микрофлоры, что приводит к возникновению дисбактериоза.

Клинические признаки заболевания у поросят характеризуются угнетением, полным или частичным отказом от корма, диареей, фекалии желтого или белого цвета. Инкубационный период длится от 18 до 72 часов, иногда до 5 суток. Типичным клиническим признаком ротавирусной болезни у поросят как и при ТГС является рвота у части животных. Через 12–14 часов после рвоты появляется понос. Более 60% заболевших поросят выздоравливают, но в дальнейшем они отстают в росте, плохо поддаются лечению и откорму и, как правило, впоследствии бракуются. Повышения температуры тела у больных животных не отмечено. На тяжесть болезни и летальность оказывает влияние сопутствующая условно-патогенная микрофлора, а также различные нарушения, связанные с ухудшением условий содержания и кормления поросят, приводящие к стрессовым состояниям и снижению резистентности организма животных к инфекции.

В РФ (НПО «Нарвак») г. Москва разработан набор вакцин против трансмиссивного гастроэнтерита и ротавирусной болезни свиней – ТР-1. В набор входят две вакцины: сухая живая вакцина против трансмиссивного гастроэнтерита и инактивированная вакцина против трансмиссивного гастроэнтерита и ротавирусной болезни из авирулентных вакцинных штаммов вируса трансмиссивного гастроэнтерита (шт. ТМК) и ротавируса свиней (шт. К), выращенных в перевиваемой культуре клеток.

Свиноматок прививают за 1–2 недели до осеменения инактивированной вакциной, а на 70–75-й день супоросности – живой и инактивированной вакциной, на 90–95 дне супоросности свиноматок ревакцинируют инактивированной вакциной против трансмиссивного гастроэнтерита и ротавирусной болезни. Сухую живую вакцину разводят 1:10 стерильным физиологическим раствором и вводят интраназально в дозе 3,0 см<sup>3</sup>, инактивированную вакцину против трансмиссивного гастроэнтерита и ротавирусной болезни вводят внутримышечно в дозе 2,0 см<sup>3</sup>. Хряков-производителей прививают инактивированной вакциной против трансмиссивного гастроэнтерита и ротавирусной болезни в дозе 2,0 см<sup>3</sup> внутримышечно и ревакцинируют через 6 месяцев.

Иммунитет у привитых животных наступает через 10–15 дней после повторного введения вакцины и сохраняется в течение 6 месяцев.

Кроме этой вакцины, в РФ разработана комбинированная вакцина против трансмиссивного гастроэнтерита, ротавирусной болезни и эшерихиоза свиней. Вакцина состоит из двух препаратов: сухой живой вакцины против трансмиссивного гастроэнтерита и инактивированной вакцины против трансмиссивного гастроэнтерита, ротавирусной болезни и эшерихиоза свиней. Вакцина содержит концентрированный вирус трансмиссивного гастроэнтерита, ротавирус и антигены эшерихий: соматические 09, 078, 0141; капсульные полисахаридные К80, К30, К87; адгезивные К88, К99, 987p, F-41; термолабильные и термостабильные энтеротоксины.

Свиноматок иммунизируют на 70–75-й день супоросности интраназально сухой живой вакциной против трансмиссивного гастроэнтерита в дозе 3,0 см<sup>3</sup> и одновременно инактивированной вакциной против трансмиссивного гастроэнтерита, ротавирусной болезни и эшерихиоза внутримышечно. На 90–95-й день супоросности свиноматок ревакцинируют внутримышечно инактивированной вакциной.

Иммунитет к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита, ротавирусу и возбудителю эшерихиоза формируется у свиноматок через 10–15 дней после повторного введения вакцины и сохраняется в течение 6 месяцев. У поросят, полученных от привитых матерей, он сохраняется на протяжении всего подсосного периода.

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

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

1.2 Штаммы ротавируса свиней могут 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.

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 ротавируса 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* 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 ротавирусу свиней:

Таблица 1 – Требования к ротавирусу свиней

№ п/п	Показатели	Единица измерения	Необходимые параметры
1	время репродукции вируса в монослое клеток СПЭВ	часы	18–48
2	оптимальная доза заражения	ТЦД 50/ мл	0,2–1,0
3	объемная доза заражения	мл/ л вир. сусп	1:30–1:100
4	оптимальное значение pH при репродукции	ед. pH	7,2–7,6
5	оптимальная температура размножения	град. С	36–37,5
6	титр инфекционности после репродукции в монослое клеток СПЭВ	lgТЦД 50/ мл	7,0 и выше
7	стерильность	кол-во колоний в мл.	не допускается
8	типоспецифичность	типовая принадлежность	типоспецифичен

## 2 ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ РОТАВИРУСА СВИНЕЙ НА ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТКАХ

2.1 Общие требования к линиям клеток для культивирования ротавируса свиней.

Культура клеток предназначена для лабораторного культивирования ротавируса крупного рогатого скота с целью изучения морфологических свойств вируса, должна 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 -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 и выдерживать колебания pH в пределах 6,6-7,4, в пассажах — до 6,8-7,3.

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

2.2 Для изучения культуральных свойств штаммов ротавируса свиней используют следующие реактивы и оборудование:

- аппарат для промывки планшетов MINI-WASHER-350 (при необхо-

димости), («Organon Teknika», Нидерланды или других изготовителей);

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

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

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

- 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;

- CO<sub>2</sub>-инкубатор, обеспечивающий инкубацию при 5% CO<sub>2</sub> и температуру нагрева плюс 37±1,0°С (Thermo, США или аналогичный других изготовителей);

- стаканы стеклянные вместимостью 50 см<sup>3</sup> ГОСТ 25336;

- пипетки 1, 5, 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 29227;

- флакон вместимостью 50 см<sup>3</sup> по действующим ТНПА;

- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

- среда Игла MEM («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 СПЭВ;

- 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 ротавируса свиней используют культуру клеток СПЭВ, которая хранится 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 плеток подсчитывают в камере Горяева под малым увеличением микроскопа. К 1 мл клеточной взвеси добавляют равный объем 0,2% раствора трипановой сини, тщательно перемешивают и направляют камеру. Количество клеток в 1 мл суспензии определяют по формуле:

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

X – количество клеток в 1 мл;

A – общее количество клеток в камере;

B – разведение суспензии.

Клетки используют для выращивания в монослое.

### 2.3.3 Выращивание клеток в монослое.

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

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

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

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

### 2.3.4 Кривоконсервирование клеток.

Для успешного кривоконсервирования клеток СПЭВ, выращенных в монослое, необходимо брать их в конечной стадии логарифмического роста. Со стекла монослой клеток снимается трипсин-версеном. Полученная клеточная суспензия должна иметь жизнеспособность не менее 95–100%. Для концентрирования и частичного освобождения суспензии от отработанной среды, ее центрифугируют при 1000 об/мин. К клеточному осадку добавляют свежую ростовую среду и доводят до концентрации 20–

35 млн. клеток/мл. В концентрат клеток добавляют 5–7% полиэтиленгликоля ММ 6000 и сразу расфасовывают в ампулы, которые запаивают на кислородной горелке или в полистироловые флаконы. Ампулы и флаконы маркируют и помещают в контейнеры. Экспозиция с 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 ротавируса свиней к культивированию.

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

Инкубацию зараженных клеточных культур проводят при температуре 37°C до появления в монослое специфического ЦПД на 20–25% (48–72 ч). После замораживания и оттаивания культуральную вирусосодержащую жидкость сливают в одну емкость, доводят рН до 7,2–7,6 и расфасовывают в пенициллиновые флаконы по 10 мл, маркируют (этикетировать) и хранят при температуре -40°C.

При освежении лиофилизированного вирусного материала его разводят на питательной среде с рН 7,5–7,6 и выращивают в матрасах с монослойной культурой клеток СПЭВ.

Второй и третий пассаж проводят аналогичным способом. После оттаивания вируса первого пассажа в водяной бане при температуре 40°C его вносят на монослойную культуру клеток СПЭВ по 5 мл на матрас или по 10 мл на роллер. Клеточные культуры предварительно отмывают от ростовой среды. Адсорбцию вируса на клетках проводят в течение 60 минут при температуре 37°C, после чего монослой клеток отмывают 2–3 раза пи-

тательной средой и вносят в матрас по 150 мл поддерживающей среды 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 ротавируса свиней:

ЦПД вируса ротавируса проявляется не ранее, чем через 18-24 часа и характеризуется массовым округлением клеток, зернистостью, дегенерацией, разрушением монослоя и отторжением клеток от стекла.

### **3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ РОТАВИРУСА СВИНЕЙ**

3.1 Инфекционную активность производственных или эпизоотических штаммов ротавируса свиней определяют методом титрования в перемываемой культуре клеток СПЭВ.

3.2 Последовательные десятикратные ротавируса 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  $10^{-1}$ . После тщательного перемешивания содержимое первой лунки переносят по  $0,1 \text{ см}^3$  во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса до  $10^{-8}$  включительно.

Из культурального планшета с выращенным монослоем культуры клеток СПЭВ удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку, переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем по  $0,1 \text{ см}^3$  каждого разведения вируса  $10^{-1}$ , затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по  $0,1 \text{ см}^3$  разведения вируса  $10^{-2}$  и так далее до разведения  $10^{-8}$  включительно.

В качестве контролей служат:

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

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

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

Титр ротавируса крупного рогатого скота вычисляют по общепринятому методу Рида и Менча и выражают в количестве инфекционных доз,

приходящихся на единицу объема ( $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ).

Инфекционная активность производственных штаммов ротавируса свиней должна быть не ниже  $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

#### **4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ РОТАВИРУСА СВИНЕЙ**

4.1 Специфичность штаммов ротавируса свиней определяют в реакции нейтрализации со стандартными гипериммунными сыворотками.

4.2 Для изучения специфичности штаммов ротавируса 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  $\text{см}^3$  по ТУ 64-16-55 или по другим действующим ТНПА;

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

- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до 0,30  $\text{см}^3$  и до 1,0  $\text{см}^3$  («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- секундомер по ГОСТ 577;

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

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

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

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

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

- цилиндр мерный вместимостью 100  $\text{см}^3$  по ГОСТ 1770;

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

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

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

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

- культура клеток СПЭВиз банка клеточных культур РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»;

- сыворотка гипериммунная против ротавируса свиней (IDEXX или

Нірга);

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

4.3.1 Реакцию ставят методом разведения вируса от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  с постоянной дозой гипериммунной сыворотки в разведении 1:10 и отрицательной (фетальной) сыворотки свиней в разведении 1:10. Последовательные десятикратные разведения ротавируса свиней от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  готовят в 24-луночном планшете. Для этого в 8 лунок вносят по 0,9 см<sup>3</sup> питательной среды. Затем в первую лунку вносят 0,1 см<sup>3</sup> нативного вируса, получая его разведение  $10^{-1}$ . Жидкость в первой лунке тщательно пипетируют дозатором и переносят 0,1 см<sup>3</sup> во вторую лунку. Операцию повторяют последовательно до получения разведения вируса  $10^{-8}$  включительно.

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

Аналогично производят смешивание отрицательной сыворотки с различными разведениями вируса.

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

4.3.2 Из планшетов с выращенным монослоем культуры клеток СПЭВ удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку переносят в первые 4 лунки с клеточным монослоем по 0,2 см<sup>3</sup> смеси сыворотки в разведении 1:10 и вируса в разведении  $10^{-1}$ . Затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по 0,2 см<sup>3</sup> 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.

4.3.4 В качестве контроля служат:

- контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и 0,1 см<sup>3</sup> поддерживающей среды);
- контроль вируса (по 4 лунки с культурой клеток, зараженных разведениями вируса 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>);
- контроль гипериммунной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с 0,05 см<sup>3</sup> гипериммунной сыворотки и 0,15 см<sup>3</sup> среды);
- контроль отрицательной сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с 0,05 см<sup>3</sup> отрицательной сыворотки и 0,15 см<sup>3</sup> среды).

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

Учет реакции проводят путем микроскопирования монослоя клеток спустя 24 часа после постановки реакции и далее ежедневно в течение 4–5 суток с целью определения цитопатических изменений в клетках. Оконча-

тельный учет проводят на 5-й день инкубации.

4.3.5 Видовую принадлежность вируса и его специфичность определяют по разности показателей между отрицательной и положительной сыворотками. Разница должна быть не менее чем на  $2,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

## **5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ РОТАВИРУСА СВИНЕЙ**

5.1 Антигенную активность штаммов ротавируса свиней проводят путем изучения иммунного ответа у лабораторных животных после их введения.

5.2 Для изучения антигенной активности штаммов ротавируса 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  $0,020-0,20, 0,20-1,0 \text{ см}^3$  по ТУ 64-16-55 или по другим действующим ТНПА;

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

- наконечники однократного применения для дозаторов пипеточных вместимостью до  $0,30 \text{ см}^3$  и до  $1,0 \text{ см}^3$  («Plastibrand», Германия или других изготовителей);

- секундомер по ГОСТ 577;

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

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

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

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

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

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

- цилиндр мерный вместимостью  $100 \text{ см}^3$  по ГОСТ 1770;

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

- шприцы инъекционные однократного применения по ГОСТ 24861;

- иглы инъекционные однократного применения по ГОСТ 25046;

- бумага фильтровальная по ГОСТ 12026;

- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

- натрий хлористый по ГОСТ 4233, раствор стерильный физиологический с массовой долей  $0,85\%$  (рН 7,2–7,4);

- среда Игла MEM («Sigma», США (номер продукта M0339, M2520)) или других изготовителей;
- среда 199 («Sigma», США (номер продукта M0393)) или других изготовителей;
- сыворотка крови эмбрионов свиней (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 ротавируса свиней;
- клинически здоровые кролики живой массой по 2,5–4,0 кг – 4 головы.

5.3 Испытание проводят на четырех клинически здоровых кроликах живой массой 2,5–4,0 кг, в сыворотке крови которых отсутствуют вируснейтрализующие антитела к ротавирусу свиней, определяемые в реакции нейтрализации. Исследуемый вирус с инфекционным титром не менее  $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  в объеме по  $3,0 \text{ см}^3$  вводят двукратно с интервалом 21 день внутримышечно каждому из четырех кроликов. Через 21 сутки после второй иммунизации у всех животных берут кровь, получают пробы сыворотки крови и исследуют на наличие вируснейтрализующих антител к ротавирусу свиней.

5.4 Постановка реакции нейтрализации с ротавирусом свиней в планшетах.

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

После этого в каждую лунку с приготовленными разведениями сыворотки добавляют по  $0,1 \text{ см}^3$  предварительно оттитрованного вируса, содержащего  $100 \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$ .

Смесь сыворотки с вирусом осторожно перемешивают, планшет закрывают крышкой и помещают в  $\text{CO}_2$ -инкубатор, где выдерживают при 5%  $\text{CO}_2$  и температуре плюс  $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  в течение 1 часа.

Из планшетов с выращенным монослоем культуры клеток СПЭВ удаляют ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку переносят в соответствующие лунки с клеточным монослоем

по 0,2 см<sup>3</sup> смеси сыворотки в разведении 1:2 и вируса, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносят по 0,2 см<sup>3</sup> смеси сыворотки в разведении 1:4 и вируса, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>, и так далее до разведения 1:64 включительно.

В качестве контроля служат:

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

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

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

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

Учет реакции проводят путем микроскопирования монослоя клеток спустя 2 суток после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учет проводят на 4–5 день инкубации.

Титр антител к ротавирусу свиней вычисляют по общепринятой методике и выражают в логарифмах с основанием 2 (log<sub>2</sub>).

Вирус считают активным при условии, что титр антител в сыворотках крови привитых кроликов в реакции нейтрализации на культуре клеток составляет 1:16 (4,0 log<sub>2</sub>) и выше.

## **6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ШТАММОВ РОТАВИРУСА СВИНЕЙ**

Генетическая идентичность и принадлежность штаммов ротавируса свиней определяется с использованием тест-системы «РОТАВИР» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологических пробах с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

6.1 Комплектация:

- «РИБО-сорб» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала;

- «РЕВЕРТА-L» вариант 50 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице- РНК;

- «ПЦР-комплект» вариант 50 R – комплект реагентов для амплификации участка – кДНК *Rotavirus*;

- «ЭФ» вариант 200 – комплект реагентов для электрофоретической детекции – продуктов амплификации в агарозном геле.

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК из клинического материала состоит из следующих ком-

понентов:

- раствор для лизиса – 1 флакон – 25,5 см<sup>3</sup>;
- раствор для отмывки 1 – 1 флакон – 20 см<sup>3</sup>;
- раствор для отмывки 3 – 1 флакон – 50 см<sup>3</sup>;
- раствор для отмывки 4 – 1 флакон – 20 см<sup>3</sup>;
- сорбент – 1 пробирка по 1,25 см<sup>3</sup>;
- РНК-буфер – 5 пробирок по 0,5 см<sup>3</sup>.

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 состоит из следующих компонентов:

- RT-mix – 5 пробирок по 0,0125 см<sup>3</sup>;
- RT-G-mix-1 – 5 пробирок – по 0,01 см<sup>3</sup>;
- Ревертаза (MMIV) – 1 пробирка, 0,03 см<sup>3</sup>;
- ПКО ДНК ADM – 1 пробирка – 0,1 см<sup>3</sup>;
- κДНК буфер – 1 пробирка – 0,5 см<sup>3</sup>;

Комплект реагентов рассчитан на 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 R состоит из следующих компонентов:

- ПЦР-смесь-1-R *Rotavirus* – 55 пробирок по 0,0005 см<sup>3</sup>;
- ПЦР-смесь-2-blue – 1 пробирка – 0,6 см<sup>3</sup>;
- минеральное масло для ПЦР – 1 пробирка – 2,0 см<sup>3</sup>;
- ПКО κДНК *Rotavirus* – 1 пробирка – 0,1 см<sup>3</sup>;
- κДНК буфер – 1 пробирка – 0,5 см<sup>3</sup>;
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 1 пробирка – 1,2 см<sup>3</sup>;
- внутренний контрольный образец (ВКО) *Rotavirus-rec* – 5 пробирок по 0,06 см<sup>3</sup>.

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 240 образцов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

#### 6.2 Упаковка и маркировка

На пробирках (флаконах) с каждым компонентом должна быть наклеена этикетка с указанием краткого наименования компонента, количества препарата в пробирке (флаконе), номера серии и даты изготовления. Комплекты реагентов упаковывают в отдельные застегивающиеся пакеты из полиэтилена. На каждый пакет наклеивают (или вкладывают) этикетку с указанием наименования комплекта, перечня компонентов, входящих в комплект, количества пробирок каждого компонента, количества препарата в каждой пробирке (флаконе), номера серии комплекта, условий хранения, даты изготовления, срока годности.

Комплекты реагентов вкладывают в картонную коробку (п/э пакет). На каждую упаковку тест-системы наклеивают (или вкладывают) этикетку, на которой указывают: наименование предприятия-изготовителя, полное

наименование тест-системы, перечень комплектов, входящих в тест-систему, номер серии, дату изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение ТУ/СТО и надпись «Для животных». В каждую упаковку вкладывают инструкцию по применению тест-системы.

#### 6.3 Транспортирование и хранение.

Тест-систему транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 5 суток. При получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Комплекты реагентов «РИБО-сорб», «ПЦР-комплект» вариант 50 R хранить при температуре от 2°C до 8°C, «РЕВЕРТА-L» – при температуре от минус 24°C до минус 16°C, «ЭФ» – при температуре от 18°C до 25°C в защищенном от света месте.

#### 6.4 Принцип метода.

Метод обнаружения РНК ротавирусов (*Rotavirus*) основан на экстракции РНК из биологического материала, совместно с РНК экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), проведении обратной транскрипции выделенной РНК, амплификации полученной кДНК. Детекция продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза в агарозном геле.

#### 6.5 Порядок отбора и подготовки проб.

Тест-система «РОТАВИР» предназначена для выявления РНК ротавирусов (*Rotavirus*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в изолятах ротавирусов, а также в фекалиях и тканях тонкого кишечника восприимчивых животных, не иммунизированных живыми вакцинами против ротавирусной инфекции.

Штаммы ротавируса в предварительной пробоподготовке не нуждаются.

#### 6.6 ПЦР-анализ

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

##### 6.6.1 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 25×15 см<sup>2</sup>;
- 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;
- отдельный халат и одноразовые перчатки из латекса;
- комплект средств для обработки рабочего места.

#### 6.6.2 Экстракция РНК при помощи комплекта реагентов «РИБО-сорб».

Внести в каждую пробирку по 50 мкл ОКО и по 5 мкл ВКО *Rotavirus-rec*. Промаркировать пробирки. В пробирки с лизирующим раствором, ВКО и ОКО внести по 50 мкл исследуемых проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) внести 50 мкл ОКО.

Плотно закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.

Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 1. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс. об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 30с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить отмывку раствором для отмывки 3.

Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 4. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой.

Поместить пробирки в термостат при температуре 60°C на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

В пробирки добавить по 50 мкл РНК-буфера, используя наконечники с аэрозольным барьером, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60°C на 2–3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12–13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции.

Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная РНК может храниться до 4 часов при температуре от 2°C до 8°C. Для длительного хранения препарата необходимо отобрать раствор РНК, перенести в стерильную пробирку и хранить при температуре не выше минус 68° С в течение года.

#### 6.6.3 Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

Подготовить необходимое количество микропробирок объемом 0,2 (0,5) мл. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix внести 5 мкл RT-G-mix-1 и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки. К полученному раствору добавить 6 мкл ревертазы (MMIv), пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки. Внести в микропробирки по 10 мкл готовой реакционной смеси. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавить 10 мкл РНК-пробы в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать.

Поставить пробирки в амплификатор (термостат) при температуре 37°C на 30 минут.

Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником добавить 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16°C в течение недели или при температуре не выше минус 68°C в течение года.

#### 6.6.4 Амплификация.

Общий объем реакции – 25 мкл, объем кДНК-пробы – 10 мкл.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

Подготовить необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-R *Rotavirus* для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2 blue, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-R *Rotavirus*. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Б. Проведение амплификации.

Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольным барьером, внести по 10 мкл кДНК исследуемых образцов, полученных в реакции обратной транскрипции РНК. Поставить контрольные реакции амплификации:

а) отрицательный контроль (К-) – в пробирку внести 10 мкл ДНК-буфера;

б) положительный контроль (К+) – в пробирку внести 10 мкл ПКО ДНК *Rotavirus*.

Запустить на амплификаторе программу (таблица 1).

Таблица 1 – Программа амплификации кДНК *Rotavirus*

Этап	Температура	Время
1	95°C	5 мин
2	95°C	1 мин с
	55°C	1 мин
	72°C	1 мин с
	Цикл повторить 42 раза	
3	72°C	1 мин
4	10°C	Хранение
	72°C	10 с
	Цикл повторить 40 раз	

После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР (зону 3).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

6.6.5 Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

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

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

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

Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. ДНК, соответственно, движется к положительному. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок работы.

Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из под слоя масла по 10–15 мкл проб и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В каждом ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен К<sup>+</sup> и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.

Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК

движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон», Россия) и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18–20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

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.

#### 6.6.6 Учет и интерпретация результатов.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной ДНК. Длина амплифицированного специфического фрагмента ДНК вируса ротавирусной инфекции свиней – 290 п.н., ВКО *Rotavirus-rec* – 514 п.н.

Учет результатов ПЦР-анализа следует начинать с результатов амплификации положительных и отрицательных контролей (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Специфическая полоса 176 п.н. на электрофореграмме
В–	экстракция РНК	есть
К–	ПЦР	нет
К+	ПЦР	есть

В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа экстракции (В–), должна быть только полоса ВКО на уровне 514 п.н.

В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (К+), должна быть яркая специфическая светящаяся полоса на уровне 290 п.н.

В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К–) не должно быть никаких полос, за исключением возможных праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.

Положительными (содержащими РНК ротавирусов (*Rotavirus*)) считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 290 п.н. большей или меньшей интенсивности, независимо от наличия полосы внутреннего контроля. Полоса внутреннего контрольного образ-

ца может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией РНК ротавирусов (*Rotavirus*).

Отрицательными считаются образцы, которые содержат только полосу 514 п.н. большей или меньшей интенсивности.

Кроме полос 290 и 514 п.н., в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

- если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в таблице 2, то соответствующий этап анализа следует переделать.

- если в дорожке какой-либо из проб отсутствуют обе полосы, и 290 и 514 п.н. – результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой клинической пробы с самого начала. Причиной могла явиться ошибка в процедуре обработки клинического материала, приведшая к потере РНК или ингибированию ОТ и/или ПЦР.

- в дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

- появление специфической полосы 290 п.н. в любом из отрицательных контрольных – образцов («В→», «К→») указывает на контаминацию реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считают недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

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

Нормативное производственно-практическое издание

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

Подписано в печать 02.03.2016.  
Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная.  
Гарнитура Times New Roman.  
Усл. печ. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ № 140.  
220003, г. Минск, ул. Брикета, 28  
Тел./факс (+375 17) 50 88 131

E-mail: [bievm@tut.by](mailto:bievm@tut.by)

---

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