МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет»

Факультет естественных наук

Т.Н. Ильичева, С.В. Нетесов, В.Н. Гуреев

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

«Вирусы гриппа»

Методическое пособие
Часть II

Новосибирск
2012

Методическое пособие ориентировано на студентов III курса факультета естественных наук и медицинского факультета, специальность микробиология и вирусология. Методическое пособие состоит из двух частей. Часть I содержит современные представления о строении и репродукции вирусов гриппа, эпидемиологии и иммунопатогенезе гриппозной инфекции. Часть II содержит подробные протоколы основных методов исследования вирусов гриппа: культивирования вирусов в культурах клеток и куриных эмбрионах, серологических методов тестирования вирусов, исследования чувствительности вирусов к противогриппозным препаратам, проведения молекулярно-генетических исследований.

Составители

Ильичева Т.Н., Нетесов С.В., Гуреев В.Н.

Методическое пособие разработано в рамках реализации Программы развития НИУ-НГУ при поддержке гранта ФЦП ГК № 14.740.11.0247 и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущей научной школы НШ-2996.2012.4.

© Новосибирский государственный университет, 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ТИТРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА 4
ПРОТОКОЛ 1. ВЕДЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР 4
ПРОТОКОЛ 2. ВЫДЕЛЕНИЕ И НАРАБОТКА ВИРУСА ГРИППА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК 11
ПРОТОКОЛ 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ТИТРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА В КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ 15
ГЛАВА 2. РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ 20
ПРОТОКОЛ 1. ПОДГОТОВКА СЫВОРОТОК, АНТИГЕНОВ И ЭРИТРОЦИТОВ 20
ПРОТОКОЛ 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА 27
ПРОТОКОЛ 3. РТГА С ЭРИТРОЦИТАМИ ИНДЕЙКИ 29
ГЛАВА 3. МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИЯ 34
ПРОТОКОЛ 1. ПОДГОТОВКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК MDCK 34
ПРОТОКОЛ 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТКАНЕВЫХ ЦИТОПАТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ ДОЗ (ТЦИД) ВИРУСА 36
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ 50
ПРОТОКОЛ 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ИСПЫТУЕМЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОМОЩИ МТТ-ТЕСТА 50
ПРОТОКОЛ 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
ПРОТОКОЛ 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ СКРИНИНГА ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ 51
ПРОТОКОЛ 4. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ 55
ПРОТОКОЛ 5. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕСТЕ АДСОРБЦИИ НЕЙТРАЛЬНОГО КРАСНОГО 60
ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ГРИППА 64
ПРОТОКОЛ 1. ОТ-ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА МАТРИКСНОГО БЕЛКА ВИРУСОВ ГРИППА ТИПА А 64
ПРОТОКОЛ 2. ОДНОСТАДИЙНАЯ ОТ-ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА НА ВИРУСА ГРИППА A/H1N1pdm2009 68
ПРОТОКОЛ 3. ДВУХСТАДИЙНАЯ ОТ-ПЦР 70
ПРОТОКОЛ 4. ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ 72
ПРОТОКОЛ 4.1. ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ НА ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ МАТРИКСНЫЙ БЕЛОК ВИРУСОВ ГРИППА ТИПА А 72
ПРОТОКОЛ 4.2. ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА H1 ВИРУСА A/H1N1pdm2009 75

ГЛАВА 1. ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ТИТРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА

ПРОТОКОЛ 1. ВЕДЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

1. МАТЕРИАЛЫ

1. Клетки MDCK во флаконах или культуральных матрасах объемом Т-25 $см^2$ мл. Используйте клетки с номером пассажа не более 25.
2. Стерильные культуральные матрасы Т-25 $см^2$, автоматические пипетки на 2, 5, 10 мл и наконечники к ним.
3. Стерильный раствор Версена (ГНЦ ВБ «Вектор»)
4. 0,05 % Трипсин-ЭДТА (Invitrogen, кат. № 25300-054).
5. Стерильная поддерживающая среда для культур клеток MDCK (ДМЕМ, 10 % сыворотка плодов крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM глютамина), 500 мл.
6. 0,4 %-ный водный раствор трипанового синего, 20 мл.
7. Диметилсульфоксид (ДМСО), хч, 100 мл.

2. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

В специально оборудованном боксовом помещении внутри кабинета биобезопасности проводят влажную уборку с дезинфицирующими агентами: либо 2–4 %-ным раствором двууглекислого натрия, либо 3–5%-ным раствором фенола, либо 3%-ным раствором хлорамина. Для надежности стерилизации перед началом работы боксовое помещение и внутреннее пространство кабинета биобезопасности облучают УФ-лучами в течение 30 минут за 1 час до работы при включенной приточно-вытяжной вентиляции. Кроме того, рекомендуется проводить профилактическое облучение боксового помещения в течение как минимум 2 часов ночью перед работой. Облучение ультрафиолетовыми лучами (с длиной волны 254 нанометров) наиболее часто используется в лабораториях

для стерилизации помещений и кабинетов биобезопасности. При длительном воздействии эти лучи вызывают гибель всех бактерий и спор грибов, хотя это зависит от мощности облучения, типа возбудителя и размера его генома.

За 30 минут до начала работы необходимо поставить емкости с питательной средой и растворами для снятия клеток в термостат на +37°С.

Непосредственно перед работой необходимо протереть внутренние поверхности бокса биобезопасности 70% этиловым спиртом, разложить в нем необходимые инструменты и материалы: спирт в закрытой посуде, стерилизованный инструмент и стерилизованную или закрытую одноразовую посуду.

3. ПРОЦЕДУРА

3.1. Пересев культуры клеток

Клетки из матраса в матрас пересеваются при достижении ≈ 90 –100 % монослоя (в конце логарифмической стадии роста).

1. Сначала автоматической пипеткой со стерильным фильтр-носиком удалите поддерживающую среду.
2. Два раза промойте клетки стерильным раствором Версена (≈ 3 мл на 25 см^2) в течение 1-2 мин.
3. Залейте монослой клеток раствором для снятия клеток: трипсин-EDTA (≈ 1 мл на 25 см^2).
4. Инкубируйте полученную суспензию в течение 30-40 минут при +37°С, периодически аккуратно покачивая. Во избежание образования конгломератов клеток не рекомендуется стучать по дну сосудов и трясти их. Обычно клетки отделяются от субстрата через 1 –40 минут (время зависит от типа клеточной линии).
5. Когда клетки полностью отделятся от поверхности флакона/матраса, добавьте 5мл полной среды ДМЕМ и тщательно диспергируйте клетки при помощи автоматической пипетки на 10 мл с фильтр-носиком.
6. Затем отмойте клетки от раствора для снятия клеток: для этого клетки осаждают в центрифужных пробирках на 4-5 мл центрифугированием

при 3000 об/мин. (L550, "ИнТех72") в течение 5 минут и ресуспендируют в том же объеме полной среды ДМЕМ.

7. Проведите подсчет клеток (см. раздел 3.2), определите концентрацию, рассчитайте необходимое количество клеток для пересева и рассейте по флаконам для культивирования. К аликвоте клеток добавьте питательную среду до конечного объема 5 –7 мл.
8. На флаконе спиртоустойчивым фломастером следует указать название культуры, дату пересева, номер пассажа, фамилию исследователя.

3.2. Использование гемоцитометра для подсчета клеток MDCK

1. Тщательно очистите гемоцитометр 70 %-ным этанолом и просушите оберточной тканью для линз или мягкой безворсовой тканью. Очистите и высушите таким же образом покровное стекло и осторожно положите его на гемоцитометр, так чтобы он покрывал подсчитываемую область.
2. Перемешайте 10мкл ресуспендированных клеток с 10 мкл трипанового синего.
3. Возьмите 10 мкл этой смеси. Поместите наконечник пипетки на край пространства под покровное стекло и медленно введите суспензию клеток, пока пространство не заполнится. Не переполняйте. См. рис. 1.

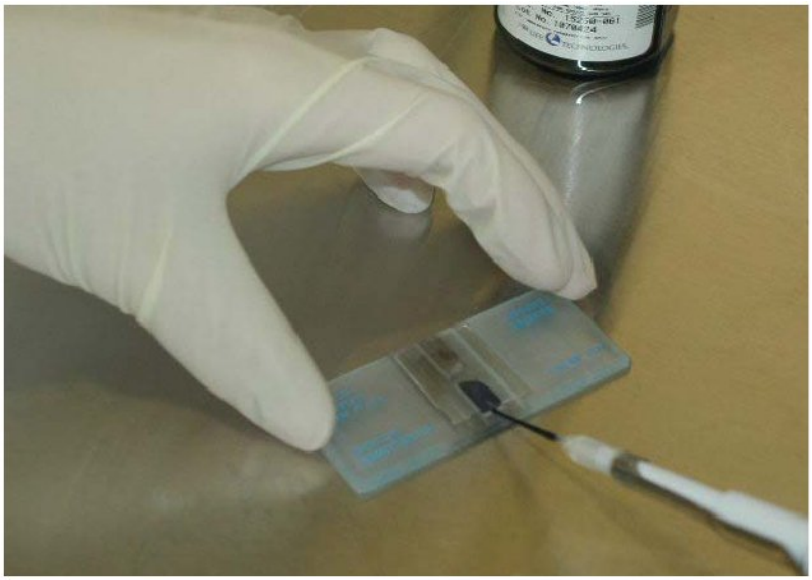


Рис. 1. Загрузка гемоцитометра суспензией клеток

4. Подсчитайте количество жизнеспособных клеток в каждом из четырех больших угловых квадратов гемоцитометра, как показано на рис. 2 (красные круги), используя 20-кратный объектив и 10-кратный окуляр микроскопа. Мертвые клетки окрасятся в синий, жизнеспособные клетки не окрасятся. Количество клеток в каждом из четырех больших угловых квадратов должно быть примерно от 50 до 100. Если количество отличается в 2 раза и больше, перезагрузите гемоцитометр и подсчитайте снова.

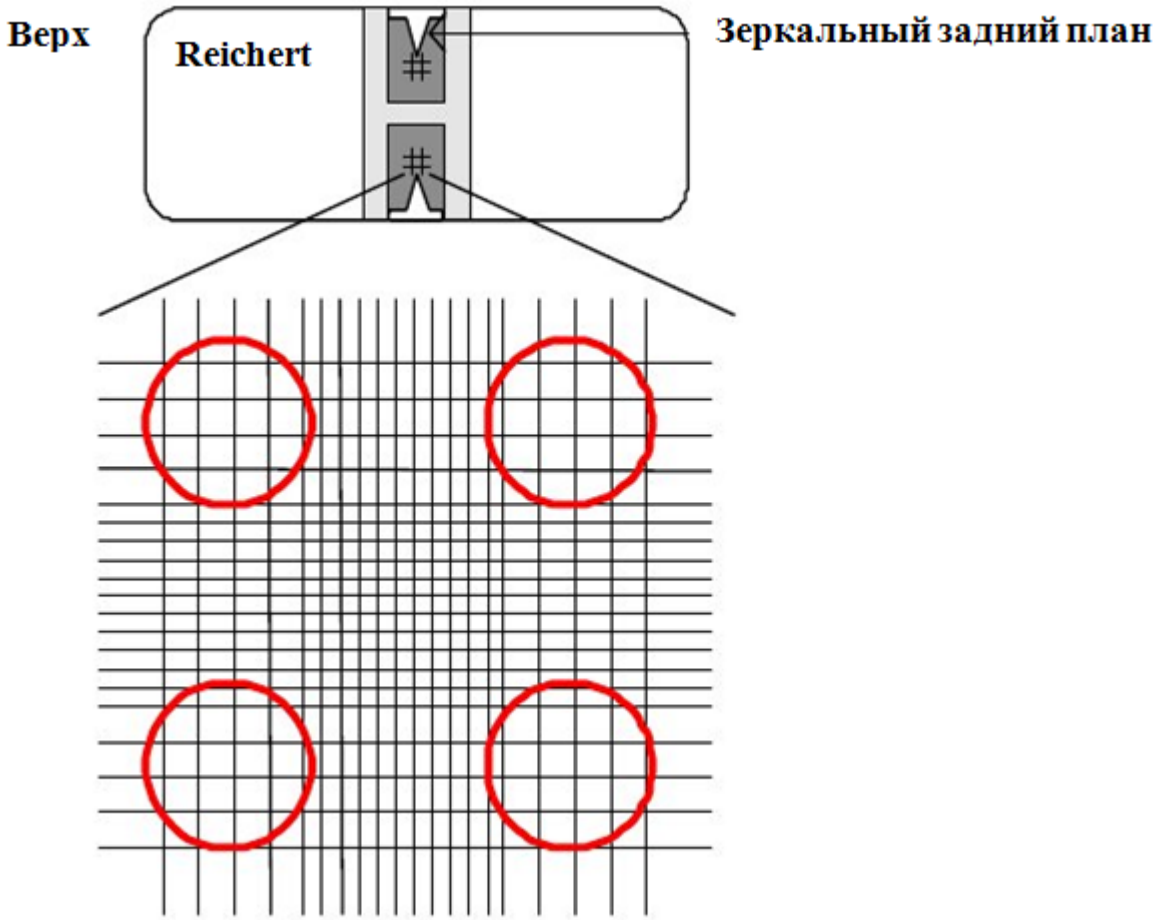


Рис. 2. Диаграмма гемоцитометра

5. После подсчета промойте емкость и покровное стекло 70 %-ным этанолом и высушите.
6. Вычисление концентрации жизнеспособных клеток проводится по формуле:

$$C = \frac{n}{v}$$

где С – жизнеспособные клетки/мл; n – конечное число жизнеспособных клеток, подсчитанных в четырех больших квадратах; v = объем суспензии в каждом квадрате.

Площадь каждого из 9 больших квадратов гемоцитометра равняется 1мм^2. Покровное стекло расположено на 0,1 мм выше основания емкости. Умножение размера площади на высоту (1 мм^2 × 0,1 мм) равняется 0,1 мм^3 или 0,1 мкл на большой квадрат.

Таблица 1. Пример подсчета клеток: разбавление суспензии клеток 1:2 в окраске трипанового синего.

	Число жизнеспособных клеток в каждом большом квадрате	Число клеток, окрашенных трипановым синим, в каждом большом квадрате
	106	0
	88	2
	99	0
	115	1
Всего жизнеспособных клеток =	**408**	Всего окрашенных клеток =**3**
Всего клеток = **411**		

Среднее количество жизнеспособных клеток на большой квадрат составляет:

$$\frac{408}{4} = 102$$

Объем суспензии клеток в пересчете на большой квадрат составляет 0,1 мкл. Поэтому концентрация клеток в подсчитываемой суспензии равняется:

$$\frac{102}{0{,}1\ \text{мкл}} - 1020\ \text{клеток/мкл};$$

1020 клеток/мкл× 10^3 мкл/мл = 1020000 клеток/мл;

1020000 клеток/мл = 1,02 × 10^6 клеток/мл.

Однако суспензия была разбавлена трипановым синим в 2 раза. Следовательно, число клеток должно быть умножено на 2, чтобы получить конечное число клеток на мл:

1,02 × 10^6 × 2 = 2,04 × 10^6 клеток/мл.

Процент жизнеспособных клеток может быть вычислен по следующему уравнению:

$$\frac{\text{кол- во жизнеспособных клеток}}{\text{конечное количество клеток}} \times 100 = \text{процент жизнеспособности клеток.}$$

$$\frac{408}{411} \times 100 = 99{,}2\ \%\ \text{жизнеспособности клеток.}$$

3.3. Замораживание клеток

Клеточные линии допускают однократное замораживание/оттаивание. Это позволяет культивировать их только тогда, когда это действительно нужно. Хранение криоконсервированных образцов клеток позволяет избежать потери культуры в результате инфекционного заражения, уменьшить генетические изменения при непрерывном культивировании, избежать старения или окончательной дифференцировки клеток. Необходимо работать так, чтобы свести количество пассажей к разумному минимуму. Схема работы с новой клеточной линией такова: разгон культуры → замораживание закладки и проведение экспериментов по ее характеризации и других опытов → сворачивание работы.

Каждому работающему с клеточными культурами необходимо иметь и поддерживать банк клеточных линий, требуемых для проведения исследований. Поэтому при разморозке ампулы из банка на первых пассажах нужно сделать очередную заморозку. Для этого следует сделать следующее:

1. Снимите клетки с поверхности культурального флакона по стандартной описанной выше методике.
2. Подсчитайте количество живых клеток.
3. Приготовьте раствор I: 4 мл ДМЕМ + 1 мл фетальной сыворотки.
4. Приготовьте раствор II: 1 мл ДМСО +2 мл фетальной сыворотки +2 мл ДМЕМ.
5. Оба раствора поставьте в холодильник на +4°С.
6. Осадите клетки центрифугированием при 3000 об/мин. (L550, "ИнТех72") в течение 5 минут, удалите супернатант, не затрагивая клеточный осадок.

7. Дальнейшие процедуры необходимо проводить на льду и в кабинете биобезопасности (ламинарном шкафу). По каплям в течение 5–7 минут в пробирку с осадком клеток внесите раствор I;
8. К клеткам с раствором I прибавьте раствор II (на льду!) в течение 5–7 минут. Конечная концентрация клеток должна быть $2–10\times10^6$/мл.
9. Разлейте суспензию клеток по криопробиркам. Клетки необходимо замораживать медленно, температура должна понижаться со скоростью ≈ 1°C в минуту. Для этого можно использовать пенопластовую коробку с толщиной стенок ~1см. В коробку укладываются ампулы с культурой и помещаются в морозильник на -70^0C -90^0C на сутки.
10. Поместите замороженные ампулы в жидкий азот или низкотемпературный холодильник на –80 °C для хранения.

3.4. Размораживание клеток

Замороженные и оттаявшие клетки весьма хрупки (плохо переносят пипетирование) и требуют аккуратного обращения. Клетки размораживают быстро и помещают сразу в полную ростовую среду. Если клетки чувствительны к криоконсервантам (ДМСО, глицерин), их центрифугируют, чтобы удалить криоконсервант, и затем суспендируют и один раз промывают в полной среде.

3.4.1. Метод с отмывкой от криоконсерванта

1. Клетки быстро разморозьте при +37°C на водяной бане.
2. На льду поместите 1–2 мл клеток в ~10мл полной среды, очень аккуратно перемешайте.
3. Центрифугируйте клетки при 100xg (L550, "ИнТех72") 5 минут и удалите супернатант.
4. Аккуратно ресуспендируйте клетки в полной среде и подсчитайте количество живых клеток.
5. Рассадите клетки в культуральные флаконы. Количество живых клеток должно быть, по меньшей мере, 3×10^5 клеток/мл.

6. На следующий день удалите питательную среду и внесите свежую.

3.4.2. Метод непосредственной посадки

1. Клетки быстро разморозьте при +37°С на водяной бане.
2. Смешайте клетки с поддерживающей питательной средой, используйте 10 мл среды на 1 мл замороженных клеток. Посадочная доза должна быть не менее 3 $\times 10^5$ клеток/мл;
3. Инкубируйте клетки от 12 до 24 часов, затем замените среду свежей, чтобы удалить криоконсервант.

ПРОТОКОЛ 2. ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА В КЛЕТКАХ MDCK

1. МАТЕРИАЛЫ

1. Клетки MDCK– Лондонская линия. Используйте клетки с числом пассажей не больше чем 25.
2. Культуральные флаконы, пипетки на 2, 5, 10 мл.
3. 0,05 % Трипсин-ЭДТА (Invitrogen, кат. № 25300-054).
4. Среда ДМЕМ.
5. Сыворотка плодов крупного рогатого скота.
6. Раствор для разведения вируса (ДМЕМ, 1% БСА, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 20 mM HEPES).
7. ФСБ (0,01М фосфатно-солевой буфер, pH=7,2).
8. 7,5% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА)
9. 1М HEPES-буфер
10. 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, Cat. # 15140-122)
11. TPCK-treated трипсин ("Sigma" T 1426). 10 г TPCK-treated трипсин растворите в 5 мл дистиллированной воды, простерилизуйте фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, расфасуйте по 0,5 мл и храните в замороженном состоянии.

2. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

Подготовка ростовой среды ДМЕМ с 10 %-ным содержанием сыворотки крупного рогатого скота (для субкультивирования клеток).

К 200 мл среды ДМЕМ добавить 20 мл эмбриональной сыворотки (10 %) и антибиотики (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина).

Подготовка среды для размножения вируса. Непосредственно перед употреблением к 76 мл среды ДМЕМ (без сыворотки) добавьте 2 мл БСА, 2мл 1М HEPES-буфера и 80 мкл TPCK-treated трипсина (конечная концентрация 2 мкг/мл). В подготовленную среду добавьте раствор антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина).

3. ПРОЦЕДУРА

3.1. Первый день эксперимента

3.1.1. Подготовка к работе

1. Подготовьте рабочее боксовое помещение и кабинет биобезопасности согласно инструкции СТБ для работы с вирусами III группы патогенности.
2. Подогрейте культуральную среду ДМЕМ в термостате до +37°С.
3. Приготовьте поддерживающую питательную среду.

3.1.2. Техника проведения

1. Снимите клетки с поверхности флаконов, как описано в протоколе 1.
2. Перенесите клетки в культуральные флаконы на 50 мл. Внесите туда же по 6 мл приготовленной питательной среды до концентрации клеток 200 тыс. клеток в 1мл.
3. Культивируйте клетки одни сутки в термостате при +37°С.

3.2.Второй день эксперимента

3.2.1. Подготовка к работе

1. Подготовьте рабочее боксовое помещение и кабинет биобезопасности согласно инструкции СТБ для работы с вирусами III группы патогенности.
2. Подогрейте поддерживающую среду ДМЕМ в термостате до +30 –37°С.
3. Разморозьте вирусную заготовку при комнатной температуре (в ламинированном боксе).
4. Оцените качество клеток, засеянных накануне, с помощью инвертированного микроскопа под увеличением ×20. В работе следует использовать флаконы с 80 –90 %-ным монослоем клеток.
5. Приготовьте среду для разведения вируса.

3.2.2. Техника проведения

3.2.2.1. Заражение культуры клеток

1. Приготовьте 10-кратные разведения вируса. Для этого в 5 пробирок типа Эппендорф на 1,5 мл внесите по 0,9 мл культуральной среды ДМЕМ, промаркируйте пробирки: –1, –2,–3, –4, –5. В первую пробирку с маркировкой –1 пипеткой на 1 мл внесите 0,1 мл вируса из размороженной вирусной заготовки. Пипетку поместите в емкость с дезинфицирующим раствором. Закрытую пробирку встряхните на вортексе. Другой пипеткой 0,1 мл суспензии из пробирки с маркировкой –1 перенесите в пробирку, маркированную –2, после чего пипетку поместите в дезраствор, пробирку встряхните на вортексе и т. д.
2. Откройте флакон с клеточным монослоем, с помощью автоматической пипетки на 10 мл удалите культуральную жидкость. Другой пипеткой внесите 8 –10 мл среды ДМЕМ, ополосните клетки и новой пипеткой удалите среду из флакона.
3. По 0,2 мл вирусной суспензии из пробирок с маркировкой –3, –4 и –5 перенесите в 3 культуральных флакона, пипетки после этого сразу помещайте в дезраствор. Закройте и промаркируйте флаконы: напишите название штамма вируса гриппа, разведение вируса, дату и фамилию

исследователя. Легким покачиванием флакона распределите суспензию по поверхности монослоя и культивируте в термостате 30 –60 минут при +37°С.

4. Через 30 –60 минут достаньте флаконы из термостата, протрите спиртом, как требуется по инструкции к работе в ламинированном боксе. Пипеткой на 10 мл внесите в каждый флакон по 8 мл среды для размножения вируса. Флаконы плотно закройте крышкой и поместите в термостат на +37°С.

5. Каждый день контролируйте начало цитопатического действия (ЦПД). Инкубируйте клетки до максимального ЦПД, обычно 5-7 дней в зависимости от штамма вируса.

3.3.Пятый день эксперимента

3.3.1. Подготовка к работе

1. Приготовьте 0,5 % суспензию эритроцитов индейки в физиологическом растворе (см. в главе 2, протокол 1), или 1% суспензию эритроцитов петуха.
2. Подготовьте бокс согласно инструкции СТБ для работы с вирусами III группы патогенности.

3.3.2. Техника проведения

1. Достаньте флаконы с культурой, зараженной вирусом гриппа, из термостата и рассмотрите клетки под инвертированным микроскопом с увеличением ×10. ЦПД вируса может проявляться частичным разрушением монослоя клеток, изменением морфологии клеток и др.
2. На V-образных планшетах подпишите название вируса и разведения, которые вы будете использовать в тесте.
3. Добавьте 50 мкл холодного ФСБ в лунки со 2 по 12 в ряд А для одного разведения (10^{-3}), в лунки со 2 по 12 в ряд В для другого разведения (10^{-4}), и в лунки со 2 по 12 в ряд С для последнего разведения (10^{-5}).
4. Добавьте 50 мкл холодного ФСБ во весь ряд Н. Этот ряд будет выполнять

функцию контроля эритроцитов.

5. Добавьте 100 мкл культуральной жидкости из флакона, зараженного вирусом в разведении 10^{-3}, в лункуА1, зараженного вирусом в разведении 10^{-4} в лунку В1, зараженного вирусом в разведении 10^{-5} в лунку С1.
6. Проведите серию двукратных разведений, перенеся 50 мкл из первой лунки в каждую последующую до 12 лунки. Из 12 лунки удалите 50 мкл.
7. Добавьте 50 мкл приготовленной суспензии эритроцитов во все лунки в рядах А, В, С и Н на планшете.
8. Аккуратно постучите по планшету, чтобы перемешать содержимое.
9. Выдержите при комнатной температуре в течение 30 минут.
10. Определите титры гемагглютининов, наклонив планшет под углом от 45° до 60°. Осевшие эритроциты в ряду Н должны «потечь» и образовать каплю наподобие слезы под действием силы притяжения. Дождитесь, пока эти эритроциты не перестанут течь, после чего отметьте те лунки, в которых эритроциты образовали «пуговки» и потекли. Наибольшее разведение вируса, которое дает полную гемагглютинацию, соответствует одной гемагглютинирующей единице (1 ГАЕ).
11. В дальнейшей работе используйте суспензию с наибольшим титром, а если титры вируса, выраженные в гемагглютинирующих единицах, оказались одинаковыми, то следует использовать суспензию, полученную от заражения культуры клеток меньшим количеством вируса (бóльшим разведением).

ПРОТОКОЛ 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ТИТРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА В КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ

Куриные эмбрионы – удобная и относительно дешевая система для культивирования вирусов. В эмбрионах в той или иной степени размножаются почти все вирусы гриппа как человеческого, так и животного происхождения. Вирус лучше всего размножается в 10 – 12-дневных эмбрионах. Перед работой следует убедиться в том, что яйца оплодотворены и эмбрионы живые. Для этого достаточно рассмотреть яйцо вблизи яркого источника в темной комнате.

При стандартном пассировании лабораторных штаммов вирусный иноculят обычно представляет собой инфицированную культуральную или аллантоисную жидкость с концентрацией 10^3 – 10^4 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл, что приблизительно соответствует 10^{-2} – 10^{-1} ГАЕ/мл. Для большинства лабораторных штаммов вируса гриппа выполняется следующее приблизительное соотношение:

1 ГАЕ = 2×10^6 единиц инфекционности для куриных эмбрионов = 2×10^5 БОЕ = 10^7 физических единиц (по данным электронной микроскопии).

Вирус вводят в аллантоисную полость, откуда он может проникать в хорионаллантоисную оболочку. Вирусное потомство выходит в аллантоисную жидкость и может быть легко извлечено из яйца. Некоторые штаммы, в частности новые природные изоляты, а также вирусы типа С плохо, размножаются на хорионаллантоисной оболочке, но хорошо растут при введении непосредственно в амниотическую полость; при этом вирус получает доступ к разнообразным тканям эмбриона, и образующееся потомство выходит в амниотическую жидкость, которую можно извлечь отдельно.

1. МАТЕРИАЛЫ

1. 10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы.
2. Сверло, инсулиновые шприцы, иглы № 25, № 23.
3. 0,9 % раствор NaCl для разведения вируса.
4. Парафин или воск.
5. Пробирки и пипетки для разведения вируса.
6. Флаконы и пипетки на 10 мл для сбора аллантоисной жидкости.

2. ПРОЦЕДУРА

2.1. Введение вируса в аллантоисную полость

1. Поместите яйцо на подставку на бок и обработайте скорлупу 70 %-ным раствором спирта.

2. Расположив яйцо перед светом, сделайте отверстие в скорлупе стерильным сверлом, стараясь не повредить внутреннюю мембрану скорлупы.
3. С помощью шприца с иглой № 25 в аллантоисную полость инокулируйте 0,1 – 0,2 мл вируса, вводя при этом иглу непосредственно под скорлупу.
4. Отверстие в скорлупе запечатайте небольшим количеством расплавленного воска.
5. Зараженные яйца инкубируйте в термостате во влажной атмосфере острым концом вниз. Время инкубации – 42 – 48 часов.

2.2. Введение вируса в амниотическую полость

1. Поместите яйца на подставку острым концом вниз, скорлупу тупого конца обработайте 70 %-ным раствором спирта и сделайте отверстие стерильным сверлом.
2. Расположите яйцо вблизи яркого источника света в темной комнате так, чтобы был виден эмбрион.
3. Иглой № 23 длиной 4 см введите в амниотическую полость 0,1 – 0,2 мл вируса и осторожно извлеките иглу.
4. Отверстие в скорлупе запечатайте расплавленным воском и инкубируйте яйца в термостате во влажной атмосфере острым концом вниз. Время инкубации – 42 – 48 часов.

2.3. Сбор вируса

Охладите яйца в течение 4–18 часов при +4°С или в течение 30 минут – при –20°С. При охлаждении эмбрион погибает (если этого не произошло раньше в результате размножения вируса), а кровеносные сосуды сужаются.

1. Сбор аллантоисной жидкости:
   а) поместите яйца на подставку тупым концом вверх и обработайте 70 %-ным раствором спирта;

б) вскройте тупой конец яйца, пользуясь стерильным пинцетом. Удалите скорлупу вокруг воздушного мешка, открывая доступ к аллантоисной полости;

в) разорвите пинцетом хорионаллантоисную мембрану, отберите аллантоисную жидкость пипеткой с широким концом и осветлите центрифугированием в течение 10 минут при 10000 g (CM-50, Elmi Ltd). Храните супернатант при +4°C (3-5 дней) или –70°C.

2. Сбор амниотической жидкости:

а) поместите яйца на подставку тупым концом вверх и обработайте 70 %-ным раствором спирта;

б) вскройте тупой конец, удаляя возможно бóльшую часть скорлупы;

в) разорвите пинцетом хорионаллантоиснуюмембрану и вылейте содержимое яйца в стерильную чашку Петри. При этом амниотическая полость должна остаться неповрежденной;

г) С помощью шприца с иглой № 25 отберите содержимое из амниотической полости и осветлите центрифугированием в течение 10 минут при 10000 g (CM-50, Elmi Ltd). Храните супернатант при +4°C (3-5 дней) или –70°C.

2.4. Титрование вирусов гриппа на куриных эмбрионах

2.4.1. Постановка титрования

1. Приготовьте 10-кратные разведения исследуемой суспензии вируса на растворе 0,9 % NaCl.
2. По 0,1 мл каждого разведения введите в аллантоисную полость десяти 10 – 12-дневных куриных эмбрионов.
3. Инкубируйте эмбрионы 48 часов при +37°C.
4. Из каждого яйца отберите по 0,025 мл аллантоисной жидкости и поместите в лунку планшета с 0,25 мл физиологического раствора.
5. Добавьте в каждую лунку по 0,025 мл 1 %-ной суспензии эритроцитов петуха или 0,5 %-ной суспензии эритроцитов индейки и через 45 ми-

нут по реакции гемагглютинации определите, в каких эмбрионах размножился вирус.

2.4.1.1. Расчет титра вируса

Имеется много способов расчета титра вируса в $ЕИД_{50}$. Один из самых удобных методов описан Томпсоном. Пример расчета приведен в табл. 2.

Таблица 2. Расчет титра вируса по Томпсону.

Разведение вируса	Доза	log (дозы)	Количество зараженных эмбрионов	«Удельная инфекционность»	«Средняя удельная инфекционность»
10^{-10}	Y 10^{-11}	-11 + log Y	0/10	0	
10^{-9}	Y 10^{-10}	-10 + log Y	0/10	0	0,033(p_0)
10^{-8}	Y 10^{-9}	-9 + log Y	1/10	0,1	0,266(p_1)
10^{-7}	Y 10^{-8}	-8+ log Y	7/10	0,7	0,600(p_2)
10^{-6}	Y 10^{-7}	-7 + log Y	10/10	1,0	0,900(p_3)
10^{-5}	Y 10^{-6}	-6 + log Y	10/10	1,0	

Средние значения подсчитывают следующим образом:

для разведений 10^{-10}, 10^{-9} и 10^{-8} $p_0 = (0 +0 +0,1) /3 = 0,033$,

для разведений 10^{-9}, 10^{-8} и 10^{-7} $p_1 = (0 +0,1 +0,7) /3 = 0,266$,

для разведений 10^{-8}, 10^{-7} и 10^{-6} $p_1 = (0,1 +0,7 +1,0) /3 = 0,600$ и т. д.

Логарифм дозы, которая даст «среднюю удельную инфекционность» = 0,5 и по определению представляет собой 1 $ЕИД_{50}$, можно рассчитать с помощью интерполяции. Очевидно, что в данном случае эта доза лежит между значениями -9+ logY и -8+ logY. Ее точноезначение можно вычислить следующим образом:

$$\frac{0,500 - 0,266}{0,600 - 0,266} = 0,7$$

и далее

$$- 9 + \log Y + 0,7 (\log 10) = – 8,3 + \log Y = 1 ЕИД_{50}.$$

Отсюда

$$\log Y = 8,3; Y = 1,99 \times 10^8.$$

ГЛАВА 2. РЕАКЦИЯ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ*

ПРОТОКОЛ 1. ПОДГОТОВКА СЫВОРОТОК, АНТИГЕНОВ И ЭРИТРОЦИТОВ

1. ПОДГОТОВКА СЫВОРОТОК

1.1.Материалы

1. Фермент, разрушающий неспецифические ингибиторы - RDE (Seiken).
2. ФСБ – фосфатно-солевой буфер
3. Пробирки, пипетки
4. Водяная баня

1.2.Процедура

Сыворотки крови животных и людей содержат различные полисахариды, включающие сиаловые кислоты, которые могут прикрепляться к гемагглютинину вируса гриппа и затруднять связывание специфических в отношении гриппа гемагглютинирующих антител. Для удаления этих неспецифических ингибиторов гемагглютинации образцы сыворотки обрабатываются ферментом, разрушающим рецептор (RDE).

1. Быстро разморозьте исследуемые сыворотки крови при +37°С на водяной бане. Сразу после разморозки поместите сыворотки в лед и держите на льду во время использования.
2. Добавьте 40 мкл образца сыворотки в пробирку.
3. Добавьте 120 мкл RDE в каждую пробирку.
4. Закройте пробирки пробками.
5. Выдерживайте на водяной бане при +37°С от 18 до 20 часов.
6. Затем поместите пробирки в водяную баню при +56°С на 30 минут.

* Протоколы разработаны в СЦ ВОЗ по гриппу (Атланта, США).

7. Добавьте 240 мкл ФСБ, pH= 7,2 в каждую пробирку. Конечное разведение сыворотки имеет соотношение 1:10. Конечный объем ≈ 400 мкл.
8. Оставьте на ночь при +4°С. Если необходимо более долгое хранение, заморозьте до –20°С или ниже.

2. ПОДГОТОВКА ЭРИТРОЦИТОВ

2.1. Материалы

1. Кровь индейки в буфере Олсвера должна быть свежей. Допустимо хранении при +4°С не более 1 недели.
2. Стерильная хлопковая марлевая салфетка (Fisher, кат. № 22-415-469).
3. Физиологический раствор с ФСБ (0,01 М ФСБ, pH= 7,2). Должен быть холодным. Хранить при температуре +4°С и держать на льду или при +4°С во время использования.
4. 70 %-ный этанол в деионизованной воде.
5. Конические центрифужные пробирки для отмывания эритроцитов.
6. Стерильные пипетки.

Примечание. 0,5 %-ные эритроциты готовятся в тот же день, когда тестируются сыворотки на неспецифические агглютинины, и могут храниться при +4°С для использования в РТГА на второй день. Остатки необходимо уничтожить в конце второго дня.

2.2. Процедура

1. Аккуратно наберите, используя пипетку объемом 10 мл, примерно 5 мл эритроцитов индейки со дна колбы. Профильтруйте через стерильную хлопковую марлевую салфетку в коническую центрифужную пробирку объемом 50 мл.
2. Осторожно наполните коническую пробирку холодным ФСБ, закройте пробкой и слегка перемешайте, переворачивая пробирку.
3. Центрифугируйте при 1200 об/мин в течение 10 минут при +4°С.
4. Удалите надосадочную жидкость, используя пипетку объемом 10 мл.

Будьте внимательны: не всколыхните осадок эритроцитов.

5. С осторожностью повторите промывку холодным ФСБ (пункты 2 – 4) еще два раза, чтобы всего было три промывки эритроцитов. Для предотвращения гемолиза всегда бережно обращайтесь с эритроцитами, держите ФСБ на льду при температуре +4°С и не промывайте эритроциты больше трех раз.
6. Удалите оставшийся супернатант при помощи микропипетки и храните уплотненные эритроциты на льду.
7. Приготовьте суспензию эритроцитов: добавьте 2,5 мл уплотненных эритроцитов к 247,5 мл холодного ФСБ в стеклянную колбу объемом 500 мл (сполосните колбу ФСБ перед использованием). Перемешайте с помощью вращательных движений.
8. Приготовьте раствор суспензии эритроцитов 1:100. Для этого добавьте 100 мкл эритроцитов к 9,9 мл холодного ФСБ в конической пробирке объемом 15 мл. Осторожно перемешайте, переворачивая пробирку.
9. Тщательно вымойте гемоцитометр 70 %-ным этанолом и протрите насухо бумагой для оптических стекол или мягкой тканью, не оставляющей ворса. Вымойте и просушите покровное стекло тем же способом и аккуратно положите его в гемоцитометр так, чтобы оно покрывало зону чувствительности счетчика.
10. Поместите 10 мкл разбавленных 1:100 эритроцитов в гемоцитометр, вставляя наконечник автоматической пипетки в канал и позволяя клеткам распределиться по счетной зоне. Будьте внимательны: не переполняйте канал.
11. Посчитайте эритроциты в каждом из 4 больших угловых квадратов в гемоцитометре, как это показано на рис. 3.

Каждое большое поле содержит 16 маленьких полей. Обратите внимание, что предполагаемое число эритроцитов в одном большом поле составляет от 40 до 60 клеток. Если количество клеток в каждом большом поле < 40, то добавьте

еще уплотненных эритроцитов и посчитайте снова. Если количество клеток в каждом большом поле > 70, то добавьте холодного ФСБ к суспензии эритроцитов и посчитайте снова. Если количество эритроцитов в больших полях отличается друг от друга более чем в 2 раза, то это указывает на неверную загрузку или плохое перемешивание эритроцитов, и следовательно, необходимо провести процедуру повторно.

a. После подсчета эритроцитов сполосните гемоцитометр и покровное стекло 70 %-ным этанолом и протрите насухо.
b. Рассчитайте, какое количество холодного ФСБ необходимо добавить для получения 0,5 %-ной суспензии эритроцитов. Для этого используйте следующую формулу:

$$\text{Полный объем суспензии эритроцитов в мл} = \frac{\text{сумма числа эритроцитов в четырех больших полях} \times 250}{160}$$

Пример:

1) Количество эритроцитов в каждом большом угловом поле

50

48

42

40

2)

$$\frac{180 \times 250}{160} - 281{,}25 \text{ мл}$$

3) (281,25 мл) – (250 мл) = 31,25 мл ФСБ надо добавить к суспензии эритроцитов.

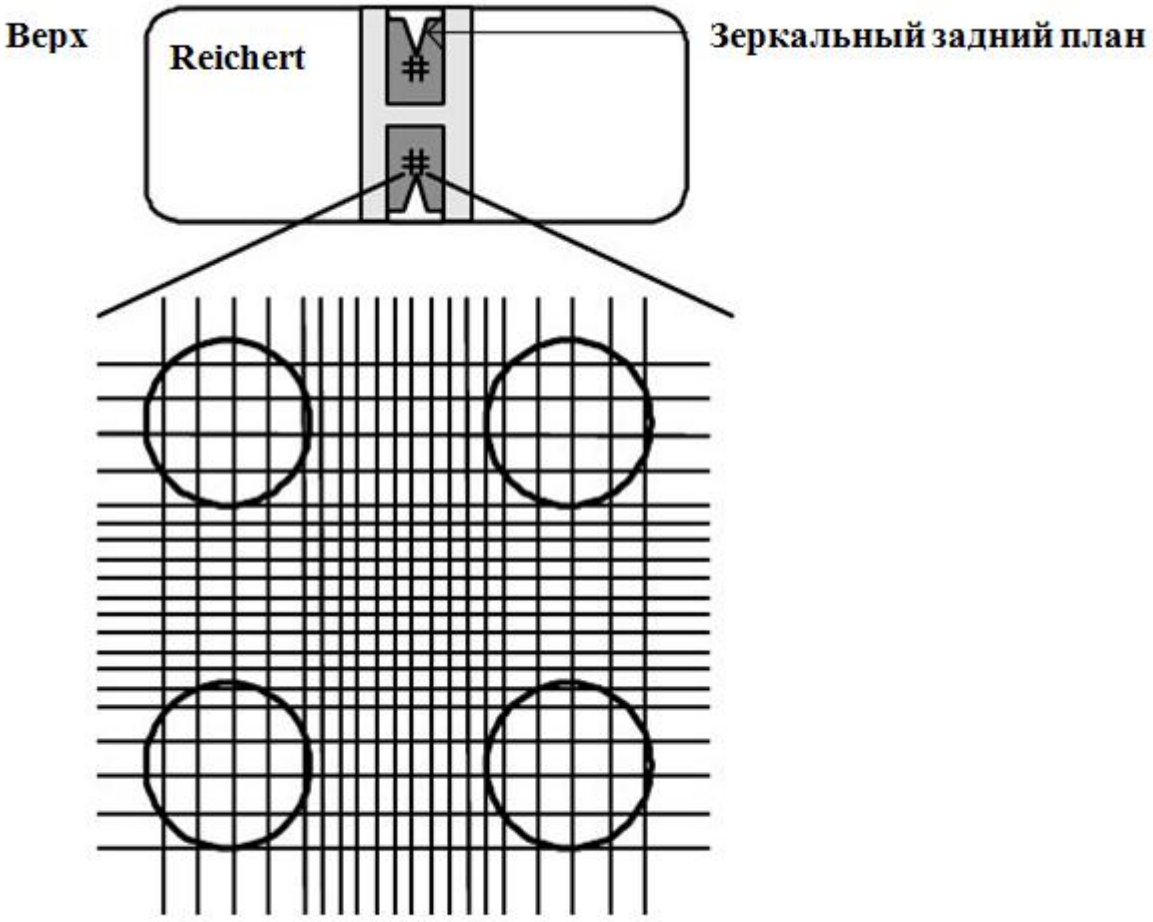


Рис. 3. Диаграмма гемоцитометра

i. Приготовление эритроцитов для удаления из сывороток неспецифических агглютининов

Примечание. Приготовьте непосредственно перед использованием и утилизируйте, когда адсорбция образцов сывороток с эритроцитами завершена.

Аккуратно наберите, используя пипетку объемом 10 мл, примерно 10 – 15 мл эритроцитов индейки со дна колбы. Профильтруйте через стерильную хлопковую марлевую салфетку в коническую центрифужную пробирку объемом 50 мл.

Далее действуйте, как описано в подразделе «Подготовка эритроцитов».

ii. Адсорбция сывороток с эритроцитами для удаления неспецифических агглютининов

Присутствие неспецифических агглютининов в образцах сывороток может привести к ложноотрицательному результату в РТГА. Наличие неспецифических агглютининов можно обнаружить, если к разбавленной сыворотке добавить раствор эритроцитов. Если наблюдается гемагглютинация, то в этом случае сыворотка должна быть адсорбирована с эритроцитами перед тестированием в реакции торможения гемагглютинации.

1. Материалы

1. Эритроциты индейки.
2. Физиологический раствор с ФСБ (0,01МФСБ,рН= 7,2). Должен быть холодным. Хранить при температуре +4°С и во время использования держать на льду.
3. Образцы сывороток, обработанных RDE.
4. Полистироловый96-луночный микропланшет с V-образным дном.
5. Стерильные пипетки.
6. Одноразовые наконечники для многоканальных пипеток.
7. Микроцентрифужные пробирки.

2. Тестирование неспецифических агглютининов. (Работа в BSC.)

1. Разделите планшет с V-образным дном пополам, прочертив линию маркером со стойкими чернилами между рядами D и E. Лунки рядов A и E будут служить для внесения в них сывороток. Сыворотки из ряда A будут тестироваться между рядами A и D. Сыворотки из ряда E будут тестироваться между рядами E и H.
2. Добавьте 25 мкл холодного ФСБ в лунки от ряда B до ряда D (с B1 – B10 до D1 – D10) для сывороток, которые будут протестированы в планшете торможения гемагглютинации № 1 и в лунки от ряда F до ряда H (с F1 – F10 до H1 – H10) для сывороток, которые будут протестированы в планшете торможения гемагглютинации № 2.
3. Добавьте по 50 мкл каждой сыворотки в лунки A1 – A10 и E1 – E10, соответствующие пронумерованным колонкам. В каждом планшете

будет содержаться 22 образца сывороток.

4. Произведите серию двукратных разведений, перенося 25 мкл сыворотки из первого ряда в последующие ряды. Другими словами, перенесите из A в B, из B в C и из C в D. Удалите 25 мкл после ряда D. Так же перенесите 25 мкл из E в F, из F в G, из G в H. Удалите 25 мкл после ряда H.
5. Добавьте 25 мкл холодного ФСБ во все лунки, содержащие сыворотки; колонки 1 – 10.
6. Добавьте 50 мкл холодного ФСБ в колонку 12 на планшете в качестве контроля эритроцитов. Колонка 11 остается пустой.
7. Слегка постучите по планшету, чтобы сыворотки хорошо перемешались с ФСБ.
8. Добавьте 50 мкл 0,5 %-ных эритроцитов индейки во все лунки кроме 11 колонки.
9. Слегка постучите по планшету для лучшего перемешивания.
10. Выдержите при комнатной температуре в течение 30 минут, чтобы эритроциты смогли осесть.
11. Наклоните планшет под углом от 45° до 60°. Осевшие эритроциты в колонке 12 должны «потечь», напоминая слезу под воздействием гравитации. Дождитесь, пока эти эритроциты не перестанут течь, и после этого запишите, в каких сыворотках произошла агглютинация эритроцитов. Агглютинированные эритроциты не «текут» и не образуют капли наподобие слезы.

Рис. 4. Примеры агглютинации эритроцитов

12. Образцы сывороток с агглютинированными эритроцитами в лунках с разведением сыворотки 1:20 или больше должны быть адсорбированы с эритроцитами до тестирования в РТГА. Если агглютинация наблюдается только в первой лунке – разведение сыворотки 1:10, – тогда адсорбция необязательна.

3. Адсорбция сывороток с эритроцитами для устранения неспецифических агглютининов. (Работа в BSC.)

1. Смешайте в микроцентрифужной пробирке 100 мкл уплотненных эритроцитов с 400 мкл сыворотки, обработанной RDE.
2. Осторожно переверните, чтобы перемешать содержимое, и выдержите 30 минут при температуре +4°C.
3. Снова осторожно переверните и выдержите еще 30 минут при температуре +4°C.
4. Центрифугируйте в микроцентрифуге Эппендорф при 600 × g в течение 5 минут.
5. Аккуратно удалите адсорбированную сыворотку, не затрагивая эритроциты.

ПРОТОКОЛ 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА

1. МАТЕРИАЛЫ

1. 0,5 %-ная суспензия эритроцитов индейки в ФСБ.
2. Физиологический раствор с ФСБ (0,01М ФСБ, pH= 7,2). ФСБ необходимо хранить при температуре +4°C.
3. Вирус гриппа.

Примечание. Вирус, наработанный в клетках MDCK или в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, должен храниться при температуре –70°C в аликвотах одноразового использования. Быстро разморозьте вирус незадолго до использования и положите на лед. После работы все остатки вируса должны

быть утилизированы. Никогда не используйте размороженный и повторно замороженный вирус!

4. Полистироловый 96-луночный микропланшет с V-образным дном.
5. Стерильные пипетки, одноразовые наконечники для многоканальных пипеток.

2. ПРОЦЕДУРА

1. На V-образных планшетах подпишите названия двух вирусов, которые вы будете использовать в тесте. Каждый вирус тестируется дважды. См. рис. 5.
2. Добавьте 50 мкл холодного ФСБ в лунки со 2 по 12 в рядах A и B для первого вируса и в лунки со 2 по 12 в рядах D и E для второго вируса.
3. Добавьте 50 мкл холодного ФСБ во весь ряд H. Этот ряд будет выполнять функцию контроля эритроцитов.
4. Добавьте 100 мкл первого вируса для тестирования в лунки A1 и B1. Добавьте 100 мкл второго тестируемого вируса в лунки D1 и E1.
5. Проведите серию двукратных разведений, перенеся 50 мкл из первой лунки в каждую последующую до 12 лунки. Из 12 лунки удалите 50 мкл.
6. Добавьте 50 мкл 0,5 %-ной суспензии эритроцитов индейки во все лунки в рядах A, B, D, E и H на планшете.
7. Аккуратно постучите по планшету, чтобы перемешать содержимое.
8. Выдержите при комнатной температуре в течение 30 минут.
9. Определите титры гемагглютининов, наклонив планшет под углом от 45° до 60°. Осевшие эритроциты в ряду H должны «потечь» и образовать каплю. Дождитесь, пока эти эритроциты не перестанут течь, после чего отметьте те лунки, в которых эритроциты образовали «пуговки» и потекли. Наибольшее разведение вируса, которое дает полную гемагглютинацию («зонтик»), считается титром гемагглютинина.
10. Разведите вирус в холодном ФСБ таким образом, чтобы приготовить

рабочий раствор, содержащий 8 ГАЕ/50 мкл. Например, у Вас получился титр НА, равный 160. Разделите его на 8, получите 20. Следовательно, вам необходимо разбавить исходный вирус в 20 раз, т. е. смешать 1 часть вируса с 19 частями холодного ФСБ.

11. Убедитесь в том, что разведенный вирус содержит 8 ГАЕ на 50 мкл, проведя вторую реакцию гемагглютинации (РГА), как описано выше. Титр вируса должен равняться 8. Если у Вас получилось другое число, использовать этот рабочий раствор вируса нельзя!
12. Храните рабочее разведение вируса на льду и используйте в тот же день.

Примечание. Стандартное рабочее разведение вируса должно иметь титр НА, равный 8 ГАЕ в 50 мкл. Это то же самое, что и 4 ГАЕ в 25 мкл. При таком титре наблюдается гемагглютинация в первых четырех лунках при титровании вируса в РГА. Если полная гемагглютинация наблюдается в 5 лунках, вирус имеет титр 16 ГАЕ/50 мкл и тестовый антиген должен быть разбавлен в 2 раза. И наоборот, если гемагглютинация наблюдается только в 3 лунках, то антиген имеет титр 4 ГАЕ/50 мкл. В этом случае к рабочему разведению вируса надо добавить такой же объем исходного вирусного раствора, какой был взят вначале. Это удвоит концентрацию вируса в рабочем разведении, чтобы дать титр 8 ГАЕ/50 мкл. Если после 1 – 2 исправлений у вас так и не получился титр 8 ГАЕ/50 мкл, процедуру приготовления рабочего раствора вируса лучше повторить сначала с постановки реакции гемагглютинации.

ПРОТОКОЛ 3. РТГА С ЭРИТРОЦИТАМИ ИНДЕЙКИ

1. МАТЕРИАЛЫ

1. 0,5 %-ная суспензия эритроцитов индейки в ФСБ.
2. Физиологический раствор с ФСБ (0,01М ФСБ, pH= 7,2). ФСБ необходимо хранить при температуре +4°С.
3. Вирус гриппа.

4. Образцы сывороток, обработанные RDE, тестированные на неспецифические агглютинины эритроцитов индейки.

Примечание. Сыворотка должна быть заморожена один раз и храниться при температуре от –20 до –70°С.

5. Полистироловый 96-луночный микропланшет с V-образным дном. В каждом планшете может быть протестировано 11 образцов сывороток.
6. Стерильные пипетки.
7. Конические центрифужные пробирки для разведения вируса.
8. Одноразовые наконечники для многоканальных пипеток.

2. ПРОЦЕДУРА

1. Быстро разморозьте сыворотки на водяной бане при +37°С. Как только сыворотки растают, держите их на льду во время работы.
2. Пронумеруйте планшеты и подпишите названия двух тестируемых вирусов. Сыворотки тестируются в повторах на двух идентичных планшетах. См. рис. 5.
3. Добавьте 25 мкл холодного ФСБ в ряды от В до Н (от В1 – В11 до Н1 – Н11).
4. Добавьте 50 мкл каждого образца сывороток в первую лунку (А1 – А10).
5. Внесите 50 мкл положительного контроля в лунку А11 одного планшета и отрицательного контроля в лунку А11 второго планшета.
6. Проведите серию двукратных разведений, перемещая 25 мкл сыворотки из А1 – 11 в лунки последующих рядов. Последние 25 мкл сыворотки из ряда Н утилизируйте.
7. Добавьте 25 мкл рабочего раствора вируса, содержащего 4 ГАЕ, в лунки, содержащие сыворотки. Обратите внимание на то, что это то же самое, что 50 мкл, содержащих 8 ГАЕ.
8. Аккуратно постучите по планшету, чтобы перемешать содержимое.
9. Выдержите при комнатной температуре в течение 30 минут.

10. Добавьте 50 мкл ФСБ в колонку 12, что послужит контролем эритроцитов.
11. Добавьте 50 мкл 0,5 %-ной суспензии эритроцитов индейки в каждую лунку.
12. Аккуратно постучите по планшету, чтобы перемешать содержимое.
13. Выдержите при комнатной температуре в течение 30 минут.
14. Учтите титры сыворотки через 30 минут инкубирования, наклонив планшет под углом от 45° до 60°. Осевшие эритроциты в колонке 12 должны «потечь» и образовать каплю. Дождитесь, пока эти эритроциты не перестанут течь, после чего отметьте те лунки, в которых эритроциты образовали «пуговки» и потекли так же, как в 12 колонке. Лунки, где произошло полное торможение гемагглютинации, будут выглядеть как контрольные. Титр сыворотки в РТГА - это разведение сыворотки в последней лунке с полным торможением гемагглютинации.

Интерпретация. Если произошло взаимодействие антиген/антитело, гемагглютинация эритроцитов будет ингибирована. Для записи данных следует пользоваться следующими знаками: знак «+» – для полной гемагглютинации («зонтик), знак «+/-» – для частичной гемагглютинации и знак «-» – для торможения гемагглютинации («пуговка»). Титр в РТГА соответствует наибольшему разведению сыворотки, которое полностью тормозит гемагглютинацию (последняя «пуговка»). Необходимо внимательно следить за инкубацией. Результат реакции следует прочитать сразу после того, как эритроциты в контроле полностью осядут.

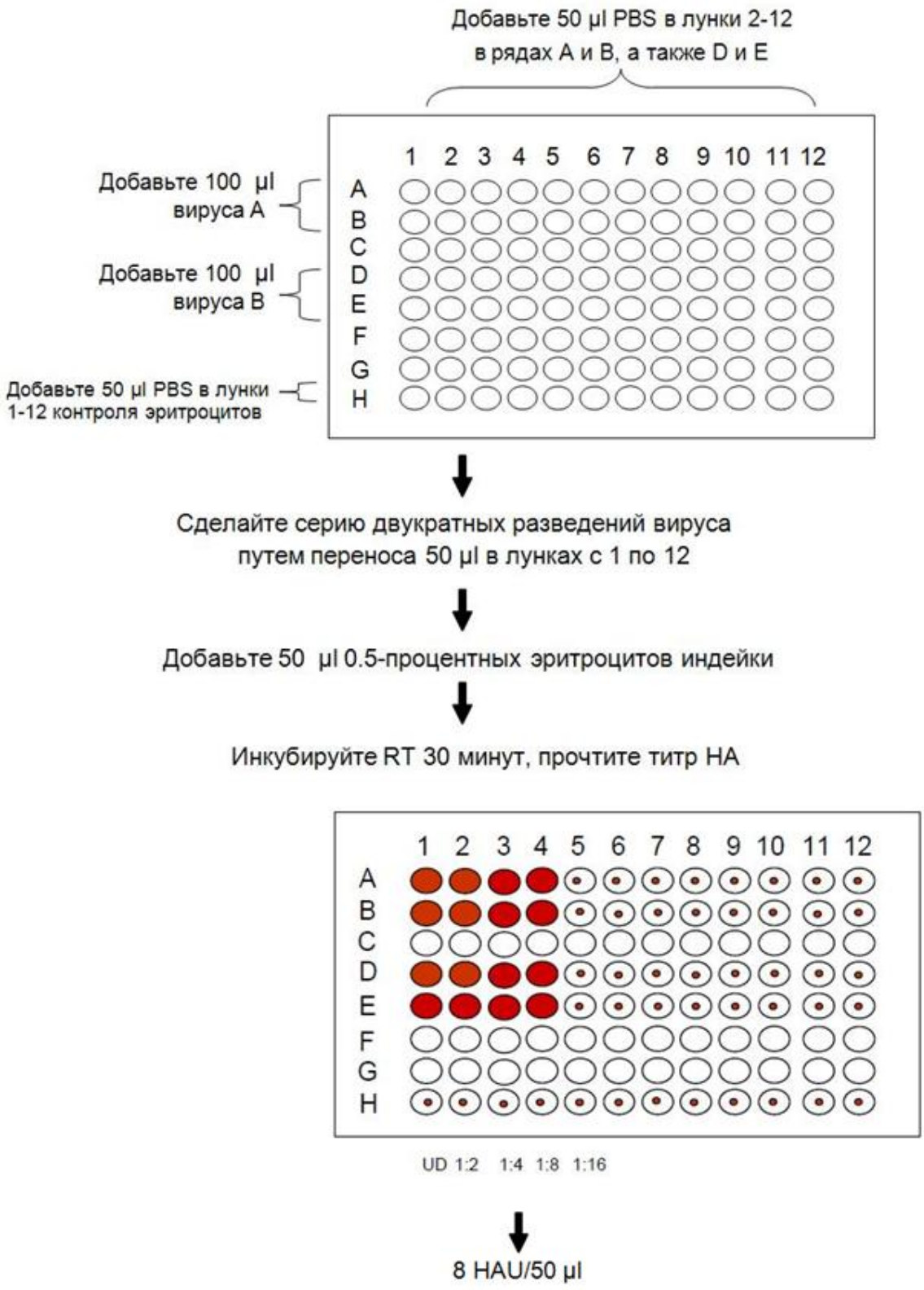


Рис. 5.Реакция гемагглютинации и приготовление рабочего раствора вируса

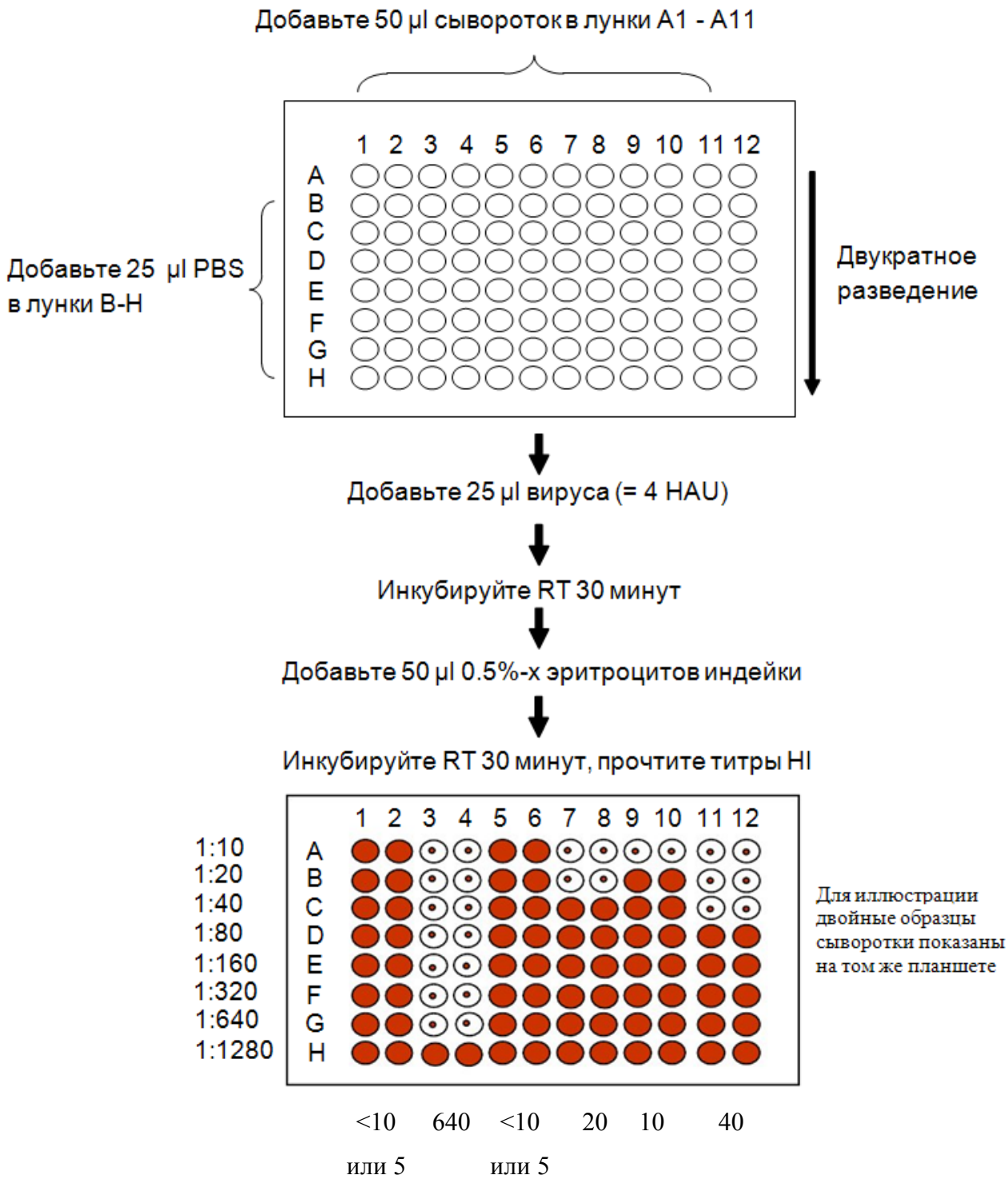


Рис. 6.Реакция торможения гемагглютинации

ГЛАВА 3. МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИЯ*

ПРОТОКОЛ 1. ПОДГОТОВКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК MDCK

Клетки MDCK впервые были взяты из почки здорового взрослого кокер-спаниеля женского пола в сентябре 1958 г. С. Х. Мадином и Н. Б. Дарби. Линия клеток MDCK для выделения вируса гриппа из клинических образцов была получена доктором Р. Вебстером из Сотрудничающего центра ВОЗ в Мемфисе в 1985 г.

1. МАТЕРИАЛЫ

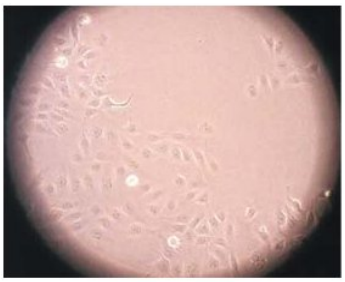
1. Клетки MDCK. Используйте клетки с номером пассажа не более 25.
2. Культуральные флаконы.
3. Трипсин-EDTA (0,05 % в EDTA).
4. Поддерживающая среда для культур клеток MDCK (ДМЕМ, 10 % эмбриональной сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM глютамина).

2. ПРОЦЕДУРА

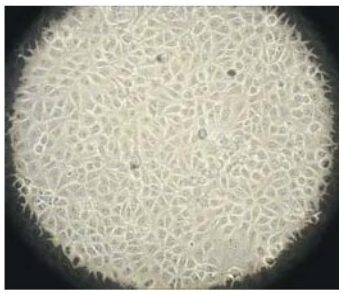
Все работы с культурой клеток должны проводиться в боксовом помещении в кабинете биобезопасности для предотвращения контаминации клеток и загрязнения окружающей среды.

Для более эффективного заражения вирусом гриппа клеткиMDCKдолжны сформировать 90 – 95 %-ный монослой. Не допускайте перероста клеток (см. рис. 7).

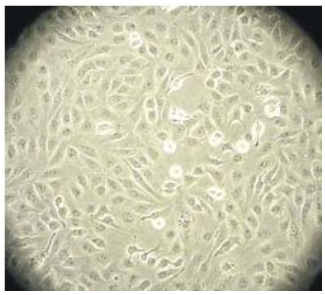
* Протоколы разработаны в СЦ ВОЗ по гриппу (Атланта, США).



Недоросшие клетки



Переросшие клетки (сдавленные, квадратные клетки)



≈ 90 %-ныймонослой (веретенообразные клетки)

Рис. 7. Формирование монослоя клетками MDCK

1. Удалите среду из культурального флакона с культурой клеток.
2. Аккуратно промойте монослой 5 мл раствора трипсина-EDTA и удалите пипеткой.
3. Добавьте 5 мл раствора трипсина-EDTA, чтобы покрыть монослой клеток.
4. Положите флакон горизонтально и инкубируйте при +37°C в 5 %CO_2 до отделения монослоя (≈ 3 – 10 минут).
5. Контролируйте состояние клеточного монослоя. Как только бóльшая часть клеток открепится от дна флакона, оставшиеся клетки могут быть сняты аккуратным постукиванием по торцевой стороне флакона.
6. Добавьте 15 мл среды MDCK в колбу с клетками, обработанными трипсином, доведя общий объем колбы до 20 мл. Пипетируйте суспензию с клетками до 5 раз, чтобы отделить клетки друг от друга.
7. Добавьте клетки в культуральные флаконы объемом 162 $см^2$, в каждом из которых содержится 30 – 50 мл среды ДМЕМ, используя объем клеточной суспензии, как описано в табл. 3.

Таблица 3. Расчет титра вируса

Разбавление	Объем клеток для добавления в новую колбу	Время формирования монослоя
1:5 (4 мл из 20 мл)	4 мл	≈ 24 часа (1 день)
1:10 (2 мл из 20 мл)	2 мл	≈ 48 часов (2 дня)
1:20 (1 мл из 20 мл)	1 мл	≈ 72 часа (3 дня)

ПРОТОКОЛ 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТКАНЕВЫХ ЦИТОПАТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ ДОЗ (ТЦИД) ВИРУСА

Метод микронейтрализации предполагает, что в каждую лунку микропланшета, содержащую сыворотку, добавляется стандартизованное количество вируса. Обычно в микронейтрализации используется 200 ТЦИД вируса.

1. ПЕРВЫЙ ДЕНЬ ЭКСПЕРИМЕНТА. ТИТРОВАНИЕ ВИРУСА

1. Подготовьте рабочее боксовое помещение и кабинет биобезопасности в соответствии с инструкцией по СТБ.
2. Быстро разморозьте пробирку с вирусом при +37°С и немедленно положите на лед. Для сохранения оптимальной инфекционности вирус должен быть разморожен непосредственно перед использованием.
3. Тестируйте вирус в двух различных разведениях. Для вирусов A/H1N1 рекомендуется использовать разведения 10^{-2} и 10^{-3}.
4. Добавьте 100 мкл ФСБ в каждую лунку 96-луночного микропланшета, исключая первую колонку.
5. Добавьте 146 мкл начального разведения вируса во все лунки первой колонки.
6. Последовательно переместите 46 мкл из первой колонки во вторую, затем в третью – до 11. Меняйте наконечник пипетки между лунками.

Примечание. Данная схема приводит к ½ $\log_{10}$ разведениям. Разведения составят 10^{-2}, $10^{-2,5}$, 10^{-3}…10^{-7} (рис. 8).

7. 12-я колонка содержит только ФСБ (вируса нет) и является контролем клеток.
8. Поместите планшеты в инкубатор с 5 %-ным CO_2 при +37°С на 1 час.
9. Приготовьте суспензию клеток MDCK, как описано в Главе 3, протоколе 1. Разбавьте суспензию до концентрации $1{,}5 \times 10^5$ клеток/мл средой ДМЕМ.

10. Добавьте 100 мкл разбавленных клеток в каждую лунку микропланшета. Каждая лунка содержит $1{,}5 \times 10^4$ клеток.
11. Инкубируйте клетки при +37°С в инкубаторе с 5 %-ным CO_2 в течение 18 – 20 часов.

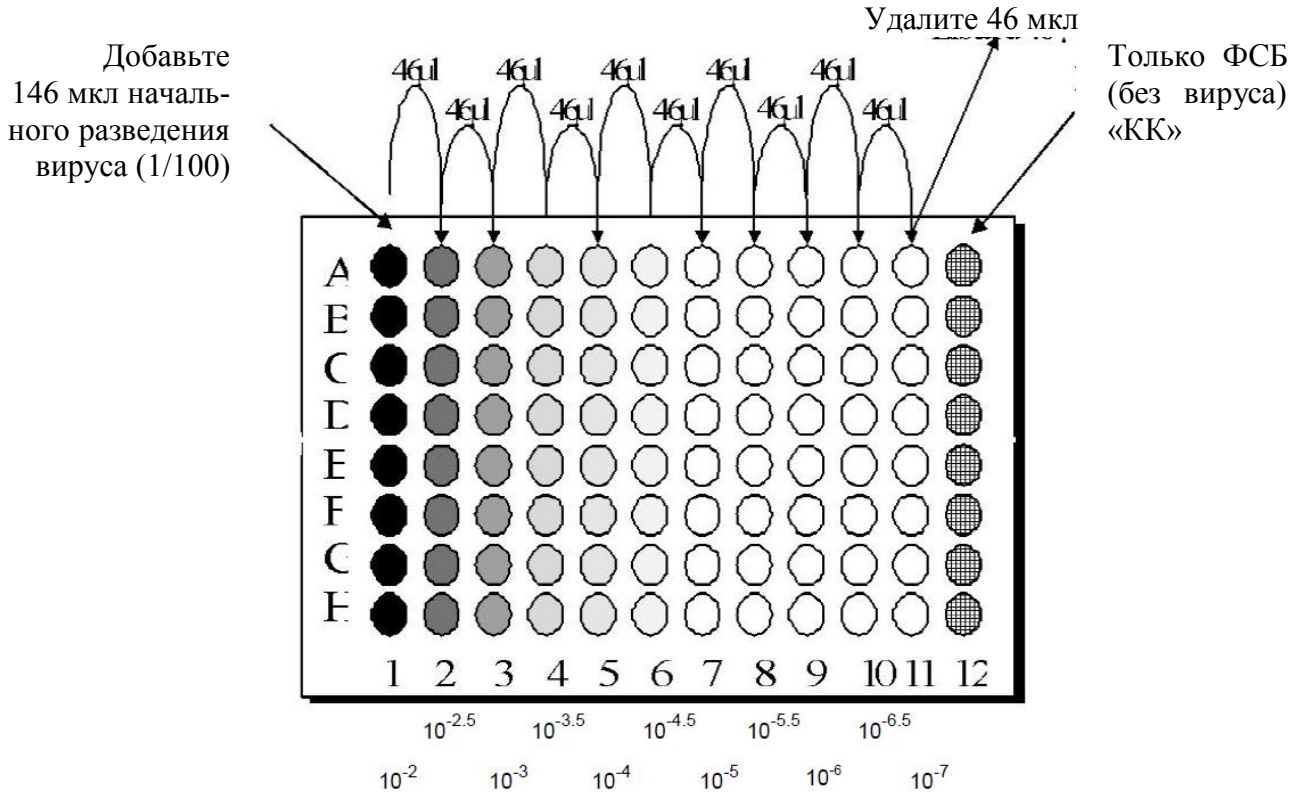


Рис. 8. Структура планшета ТЦИД

2. ВТОРОЙ ДЕНЬ ЭКСПЕРИМЕНТА. ELISA

ELISA – процедура фиксации клеток планшета, внесение первого антитела, второго антитела и субстрата такая же, как описано в 3.2.2.2.

2.1. Определение ТЦИД

1. Определите оптическую плотность (OD) контроля клеток (колонка 12).
2. Любая тестируемая лунка с OD, превышающая в 2 раза OD контроля клеток (КК), считается положительной.
3. Подготовьте таблицу, как показано ниже (табл. 4). Подсчет ТЦИД проводится при помощи метода Рида – Менча.

Таблица 4. Подсчет ТЦИД методом Рида – Менча

Наблюдаемый объем	Совокупный объем

Разбавление	(OD)					
	Пол. число	Отр. число	Пол. Σ↑	Отр. Σ↑	Соотношение	Пол. %
10^{-2}	8	0				
$10^{-2,5}$	8	0				
10^{-3}	8	0				
$10^{-3,5}$	8	0				
10^{-4}	8	0	16	0	16/16	100
$10^{-4,5}$	7	1	8	1	8/9	89
10^{-5}	1	7	1	8	1/9	11
$10^{-5,5}$	0	8	0	16	0/16	0
10^{-6}	0	8				
$10^{-6,5}$	0	8				
10^{-7}	0	8				

4. Запишите положительные и отрицательные показатели для каждого разведения.
5. Выберите область данных, где происходит переход от всех положительных лунок ко всем отрицательным лункам. Эта область показана в табл. 4. Далее все подсчеты касаются только этой области.
6. Подсчитайте совокупный показатель положительных лунок в каждом разведении. Совокупный положительный показатель для данного разведения получается путем прибавления положительных лунок, начиная снизу таблицы.
7. Подсчитайте совокупное число отрицательных лунок в каждом разведении, начиная сверху.
8. Определите соотношение в каждом разведении по формуле:

$$\text{Соотношение} = \frac{\text{сумма совокупных положительных}}{\text{сумма совокупных пол.} + \text{сумма совокупных отриц.}}$$

9. Пересчитайте соотношение в процентах.
10. Если в 9-ом пункте Вы получили разведение, в котором 50 % положительных лунок, переходите к 12 пункту для определения 200 ТЦИД в 50 мкл.
11. Если нет, вычислите пропорциональный отрезок между разведением, показывающим > 50 % положительных, и разведением, показывающим < 50 % положительных, как описано ниже:

$$\text{Пропорциональный отрезок} = \frac{\text{\% пол. объема выше 50 \%} - 50}{\text{\% пол. объема выше 50 \%} - \text{\% пол. объема ниже 50 \%}} \times \text{поправочный коэффициент}$$

$$= \frac{89 - 50}{89 \quad 11} \times 0{,}5 \; = \; 0{,}5 \; \times \; 0{,}5 \; = \; 0{,}25$$

Серии разведений	Поправочный коэффициент	Примеры разведений
(двукратные разбавления) $\log_2$	0,3	1/2, 1/4, 1/8, 1/16,
(½ log разбавления) ½ $\log_{10}$	0,5	10^{-2}, $10^{-2,5}$, 10^{-3}, $10^{-3,5}$…
(пятикратные разбавления) $\log_5$	0,7	1/2, 1/10, 1/50, 1/250…
(десятикратные разбавления) $\log_{10}$	1,0	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}…

12. Вычислите ТЦИД путем прибавления пропорционального отрезка к разведению, показывающему > 50 % положительных. Например, в табл. 4 прибавьте 0,25 к 4,5, чтобы получить $10^{-4,75}$.

13. Так как каждая лунка содержит 100 мкл разведения вируса, ТЦИД выражается как ТЦИД/100 мкл. 1 ТЦИД в этом случае составит $10^{-4,75}$/100 мкл.

200 ТЦИД = $10^{-2,45}$/100 мкл | $\frac{1 \text{ ТЦИД}}{10^{-4,7}} = \frac{200 \text{ ТЦИД}}{x}$ | $x = 10^{-2,45}$

200 ТЦИД= $10^{-2,15}$/50 мкл | $10^{-2,45} \times 2$ (одинаковое к-во вируса в ½ объема) = $10^{-2,15}$

$10^{-2,15}$ = 1/102,15 = 1/141 разведение вируса для достижения 200 ТЦИД в 50 мкл.

14. Для постановки микронейтрализации разбавьте суспензию вируса так, чтобы 50 мкл содержали 200 ТЦИД. Один ТЦИД на 100 мкл объема должен составлять как минимум $10^{-4,6}$, с тем чтобы разбавить вирус как минимум 1:100 для достижения 200 ТЦИД на 50 мкл объема. Это связано с тем, что для анализа микронейтрализации вирус необходимо разбавить не менее чем в 100 раз.

3. МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИЯ

3.1. Материалы

1. Клетки MDCK – Лондонская линия. Используйте клетки с пассажным числом не больше чем 25.
2. Культуральные флаконы, пипетки, пробирки.
3. Трипсин-ЭДТА (0,05 % трипсина с ЭДТА).
4. Раствор для разведения вируса (ДМЕМ, 1 % BSA, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 20 mM Hepes).

5. ФСБ (0,01М ФСБ, pH= 7,2).
6. Фиксатор: холодный 80 %-ный ацетон в ФСБ.
7. Буфер для отмывания клеток: ФСБ + 0,3 % Твин 20.
8. Буфер для разведения антител: ФСБ + 0,3 % Твин 20 + 5 % молока.

Используйте только свежеприготовленный раствор, который готовится следующим образом:

В 1000 мл ФСБ внесите 3,0 мл Tween 20 и добавьте 50 г сухого обезжиренного молока. Перемешайте на магнитной мешалке как минимум 30 минут перед использованием.

9. Первые антитела. Моноклональные антитела мыши против белка нуклеопротеина гриппа А (Millipore, кат. № MAB8257 & MAB8258).
10. Вторые антитела. Антимышиные lgG козы с пероксидазой хрена (HRP) (KPL, кат. № 074-1802).
11. Субстрат: ОФД в цитратном буфере. Подготовьте ОФД непосредственно перед использованием.
12. Стоп-реагент (0,5 М серная кислота).
13. Образцы сыворотки для тестирования.

Примечание 1. Все образцы сыворотки должны храниться при –20°С или ниже. Быстро разморозьте сыворотки на водяной бане при +37°С. Как только разморозили, положите на лед. Держите на льду или при +4°С до повторного помещения в морозильную камеру. Если будете использовать материал из той же аликвоты на следующий день, то допустимо держать образцы сыворотки при +4°С в течение ночи.

Примечание 2. Перед использованием в микронейтрализации образцы сыворотки человека должны быть инактивированы нагреванием при +56°С в течение 30 минут. Образцы сыворотки животных, например, положительные и отрицательные контрольные сыворотки, перед использованием должны быть обработаны RDE.

14. Вирус гриппа.

Примечание. Вирус, наработанный в клетках MDCK или в аллантоисной жидкости РКЭ, должен храниться при –70°С в одноразовых аликвотах. Никогда не используйте вирус, прошедший стадии заморозки – разморозки. Быстро разморозьте вирус перед использованием и положите на лед. Как только разведение вируса для анализа подготовлено, все остатки вируса в размороженной аликвоте должны быть соответствующим образом утилизированы.

15. 70 %-ный этанол.

16. 96-луночные культуральные микропланшеты с плоским дном.

17. Конические центрифужные пробирки.

18. Одноразовая емкость для многоканальных пипеток.

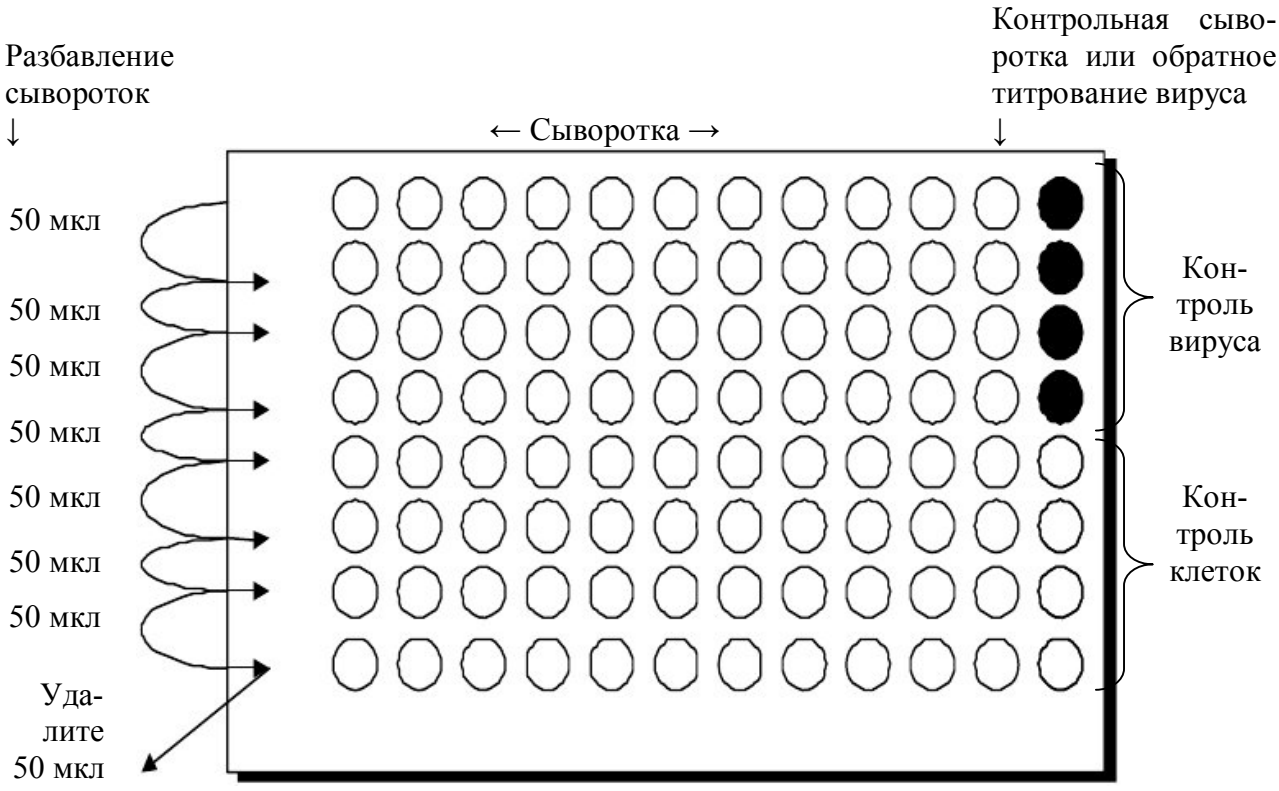


Рис. 9. Структура планшета для микронейтрализации

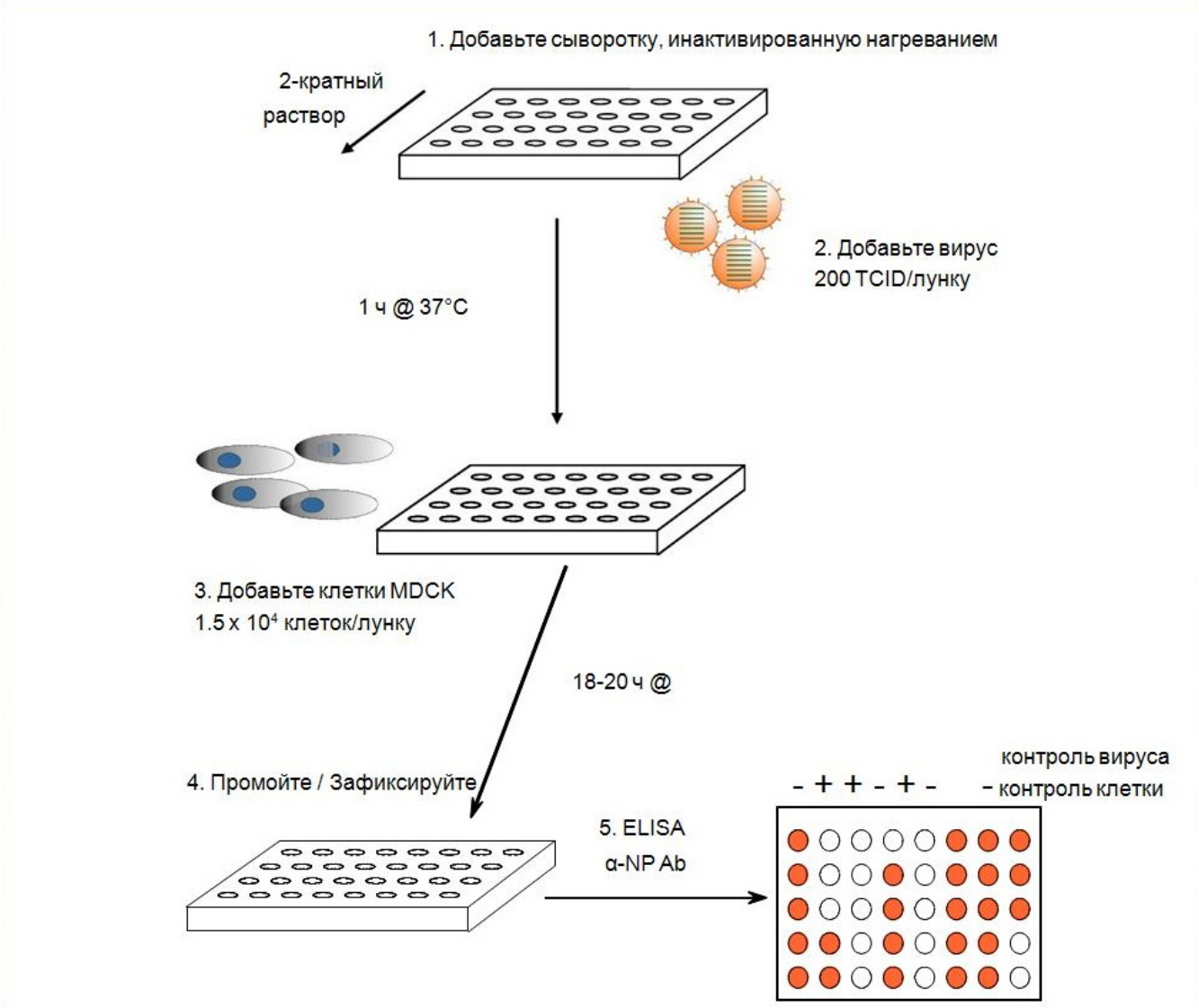


Рис. 10. Общая схема проведения анализа микронейтрализации

3.2. Процедура

3.2.1. Первый день – нейтрализация

3.2.1.1. Подготовка и разведение тестируемых сывороток

1. Быстро разморозьте сыворотки при +37°C на водяной бане. Сразу после разморозки поместите сыворотки в лед и держите во льду во время использования.
2. Добавьте 50 мкл образца сыворотки в микропробирку.
3. Инактивируйте неспецифические ингибиторы в сыворотке нагреванием в течение 30 минут при +56°C на водяной бане. Обработанные на-

греванием сыворотки могут храниться при +4°C в течение ночи или при –20°C более долгое время.

4. Добавьте 200 мкл раствора для разведения вируса в каждую пробирку, чтобы получить разведение сыворотки 1:5.
5. Приготовьте штатив с пробирками, аналогичный 96-луночному планшету, и поместите пробирки с сыворотками в позиции от A1 до A10
6. В остальные пробирки (B1-B10 – H1-H10) внесите 250 мкл раствора для разведения вируса
7. Приготовьте двукратные разведения сывороток, перенося 125 мкл от одного ряда к другому (от A до H).
8. Удалите 125 мкл из ряда H после перемешивания.
9. Добавьте 125 мкл раствора для разведения вируса во все пробирки в рядах от A до H, в колонки с 1 по 10. В ряду A получилось разведение 1:10, в ряду B 1:20 и т.д. Конечный объем в каждой пробирке равняется 250 мкл.
10. Соберите все штативы и накройте крышкой.
11. Выдерживайте при +37°C в инкубаторе с 5 %-ным CO_2, пока готовите вирус.
12. Перенесите по 50 мкл каждого разведения сыворотки в соответствующую лунку микропланшета (по 2 планшета на каждый вирус, всего 2 вируса), начиная с ряда H и двигаясь по направлению к ряду A. Не забудьте менять наконечники перед работой со следующей сывороткой.
13. Разведение сыворотки в лунке A равно 1:10, в лунке B – 1:20, в лунке C – 1:40, в лунке D – 1:80, в лунке E – 1:160, в лунке F – 1:320, в лунке G – 1:640, в лунке H – 1:1280.

3.2.1.2. Добавление вируса

1. Разведите вирус до концентрации 200 ТЦИД на 50 мкл. На каждый планшет необходимо 5 мл разбавленного вируса.

2. Добавьте 50 мкл разбавленного вируса во все лунки в колонках с 1 по 12, исключая колонку 11 и лунки E12, F12, G12 и H12. Колонка 11 используется для обратного титрования вируса, а лунки E12, F12, G12 и H12 для контроля клеток. Аккуратно постукивайте по планшету для перемешивания.
3. Добавьте 50 мкл раствора для разбавления вируса в лунки контроля клеток.
4. В каждый анализ включайте обратное титрование рабочего разведения вируса. Для этого добавьте 50 мкл раствора во все лунки колонки 11. Добавьте 50 мкл рабочего разведения вируса (то есть 200 ТЦИД) в первую лунку (A11). Перемешайте пипетированием. Сделайте серию двукратных разведений, перенося 50 мкл из первой лунки в каждую последующую вплоть до лунки H11. Удалите 50 мкл из лунки H11. Добавьте дополнительные 50 мкл раствора во все лунки колонки 11.

   Содержимое лунок: A – 100 ТЦИД, B – 50 ТЦИД, C – 25 ТЦИД, D – 12,5 ТЦИД, E – 6,3 ТЦИД, F – 3,1 ТЦИД, G – 1,6 ТЦИД и H – 0,8 ТЦИД. Добавьте 50 мкл раствора в каждую лунку колонки 11, чтобы довести конечный объем до 100 мкл.
5. Убедитесь визуально, что все лунки содержат 100 мкл. Аккуратно постукивайте по планшетам для перемешивания. Соберите все планшеты и накройте пустым планшетом.
6. Выдерживайте при +37°C в инкубаторе с 5 %-ным CO_2 в течение 1 часа.

3.2.1.3. Подготовка клеток MDCK

1. Проверьте качество клеток MDCK. Должен быть 80 – 95 %-ный монослой. Один флакон T-162 $см^2$ при 95 %-ном монослое содержит достаточное количество клеток для посева примерно на 4 – 5 микропланшетов.
2. Разогрейте трипсин-ЭДТА при +37°C на водяной бане.

3. Среду удалите пипеткой.
4. Аккуратно промойте монослой 20 мл ФСБ и удалите, используя пипетку.
5. Добавьте 7 мл трипсина-ЭДТА, чтобы покрыть клеточный монослой.
6. Положите флакон и инкубируйте при +37°С в 5 %-ном CO_2, пока клетки не отделятся от дна флакона (8 – 10 минут).
7. Добавьте во флакон 7 мл раствора для разведения вируса. Пипетируйте суспензию для отделения клеток друг от друга. Перенесите клетки в коническую пробирку объемом 50 мл.
8. Заполните коническую пробирку раствором для разведения вируса. Центрифугируйте при 1500 об/мин в течение 5 минут. Это первая отмывка.
9. Удалите пипеткой супернатант и проведите вторую промывку клеток, ресуспендируя клетки в 10 мл раствора. Пипетируйте суспензию для отделения клеток друг от друга.
10. Проведите вторую отмывку, как описано выше.
11. Удалите пипеткой супернатант и ресуспендируйте клетки в 10 мл раствора. Для подсчета добавьте раствор для разбавления клеток. Оцените необходимый конечный объем клеток, примерно 10 мл на микропланшет. Разделите конечный объем клеток на три, чтобы получить объем раствора для ресуспендирования в нем клеток. Для 400 мл клеток добавьте 120 мл раствора к 10 мл суспензии клеток. Этот подход хорошо работает, если клетки были с 90 – 95 %-ным монослоем. Если клетки были меньше чем с 90 %-ным монослоем, то уменьшите объем добавляемого раствора. Осторожно перемешайте.
12. Подсчитайте клетки при помощи гемоцитометра.
13. Доведите концентрацию клеток до $1{,}5 \times 10^5$ клеток/мл.
14. Добавьте 100 мкл клеток в каждую лунку микропланшета. Каждая лунка содержит $1{,}5 \times 10^4$ клеток.
15. Соберите все планшеты и накройте пустым планшетом.

16. Выдерживайте при +37°C в инкубаторе с 5 %-ным CO_2 в течение 18 – 20 часов.

3.2.2. Второй день – ELISA

3.2.2.1. Фиксация планшета

1. Удалите среду из микропланшетов многоканальной пипеткой в специальный контейнер внутри ламинарного шкафа.
2. Добавьте 200 мкл ФСБ в каждую лунку для промывки.
3. Удалите ФСБ многоканальной пипеткой в специальный контейнер.
4. Добавьте 100 мкл холодного фиксатора в каждую лунку. Не допускайте высыхания лунок.
5. Соберите все планшеты и накройте пустым планшетом.
6. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 10 – 12 минут.
7. Удалите фиксатор многоканальной пипеткой в специальный контейнер.
8. Распылите 70 %-ный этанол на бумажное полотенце и протрите внешнюю часть планшетов.
9. Дайте планшетам высохнуть внутри ламинарного шкафа в течение 10 минут или до высыхания.
10. Визуально проверьте монослой клеток в каждой лунке и отметьте в рабочем журнале лунки с поврежденным монослоем. Сравните монослой с тем, что наблюдалось в контроле клеток. В лунках с самым низким разведением сыворотки, скорее всего, будут поврежденные клетки вследствие токсичности сыворотки.
11. Планшеты можете хранить при +4°C до двух дней.

3.2.2.2. ELISA

Первые антитела (IgG мыши против нуклеопротеина гриппа А).

1. Растворите первые антитела в буфере для разведения антител. Хорошо перемешайте на магнитной мешалке.

2. Промойте планшеты трижды, внося в лунки по 300 мкл промывочного буфера.
3. Добавьте 100 мкл разбавленных первых антител в каждую лунку.
4. Соберите планшеты и накройте пустым планшетом.
5. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 часа.

Вторые антитела (антимышиные IgG козы, меченные HRP).

1. Разведите вторые антитела в буфере для разведения антител. Хорошо перемешайте на магнитной мешалке.
2. Промойте планшеты трижды из расчета 300 мкл промывочного буфера на лунку.
3. Добавьте 100 мкл разбавленных вторых антител в каждую лунку.
4. Соберите планшеты и накройте пустым планшетом.
5. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 часа.

Субстрат

1. Приготовьте цитратный буфер следующим образом: 1 таблетку цитратного буфера (Sigma-Aldrich, кат. № P4922) растворите в 100 мл деионизованой H_2O и хорошо перемешайте.
2. Промойте планшеты 5 раз из расчета 300 мкл промывочного буфера на лунку.
3. Приготовьте субстрат непосредственно перед использованием следующим образом: в 100 мл цитратного буфера растворите 5 таблеток орто-фенилендиаминдигидрохлорида (ОФД) (Sigma-Aldrich, кат. № P8287) и хорошо перемешайте.
4. Добавьте 100 мкл свежеприготовленного ОФД в каждую лунку. Не собирайте планшеты во время инкубирования субстрата.
5. Инкубируйте при комнатной температуре до сильного изменения цвета в контроле вируса (колонка 12, ряды от A до D).
6. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку.
7. Определите оптическую плотность (ОП) каждой лунки при 490 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра.

Анализ данных

1. **Контроль клеток и контроль вируса.** Контроль клеток должен иметь значение OD < 0,2. Контроль вируса должен иметь значение OD > 0,8, чтобы можно было доверять данным эксперимента.
2. **Обратное титрование вируса.** Обратное титрование вируса оценивается для определения того, содержит ли рабочее разведение использованного при анализе вируса нужное количество вируса.

Пороговое значение обратного титрования вируса – это двукратное значение OD в контроле клеток. Чтение от дна планшета, то есть от ряда H, определяет количество вируса, добавленного в анализ, следующим образом:

а) если OD в лунке H11 больше порогового значения, то количество вируса, используемого при анализе, ≥ 400 ТЦИД/50 мкл;

б) если OD в лунке G11 больше порогового значения, то количество вируса, используемого при анализе, = 200 ТЦИД/50 мкл;

в) если OD в лунке F11 больше порогового значения, то количество вируса, используемого при анализе, = 100 ТЦИД/50 мкл;

г) если OD в лунке E11 больше порогового значения, то количество вируса, используемого при анализе, = 50 ТЦИД/50 мкл;

д) если OD в лунке D11 больше порогового значения, то количество вируса, используемого при анализе, = 25 ТЦИД/50 мкл.

Для достоверного анализа данные обратного титрования вируса, проведенные дважды, должны составлять 200/200, 200/400 или 200/100.

3. **Титр нейтрализующих антител.** Вычислите пороговое значение для определения 50 %-ного титра нейтрализующих антител для каждого планшета по следующему уравнению:

$$\frac{(\text{осн. OD лунок с контролем вируса}) - (\text{осн. OD лунок с контролем клеток})}{2} + (\text{осн. OD лунок с контролем клеток}) = x$$

В упрощенном виде уравнение выглядит так:

½ основного OD лунок с контролем вируса + ½ основного OD лунок с контролем клеток =*x*

или

$$\frac{(\text{контроль вируса} + \text{контроль клеток})}{2} - x,$$

где x = 50 % порог.

Все значения ниже или равные x - положительны. Прочитайте каждую колонку, содержащую разведения сыворотки, снизу, начиная от лунки H. Отметьте первую лунку с OD меньше 50 %-ного порога. Разведение сыворотки, соответствующее этой лунке, будет 50 %-ным титром нейтрализующих антител для данного образца сыворотки. Разведения сывороток следующие: в лунке A – 1:10, в лунке B – 1:20, в лунке C – 1:40, в лунке D – 1:80, в лунке E – 1:160, в лунке F – 1:320, в лунке G – 1:640, в лунке H – 1:1280.

4. **Контроль образцов сыворотки.** Для того чтобы доверять данным анализа, контроль образцов сыворотки должен соответствовать следующим условиям:
   а) Образец отрицательной сыворотки: титр должен быть ≤ 20;
   б) образец положительной сыворотки: титр должен быть ≥ 80.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

ПРОТОКОЛ 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ИСПЫТУЕМЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОМОЩИ МТТ-ТЕСТА

1. МАТЕРИАЛЫ

1. 96-луночные плоскодонные планшеты (Orange Scientific, Бельгия, кат. № 5530100).
2. Целлюлозно-ацетатный мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, кат. № 430320).
3. Одно- и многоканальные пипетки от 1 мкл до 1000 мкл (Ленпипет, Россия).
4. CO_2-инкубатор (Heraeus, США).
5. ИФА-ридер (BioRad).
6. МТТ (3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) (Sigma, США, кат. № M5655).
7. Питательная среда для культивирования клеток ДМЕМ (БиолоТ, Россия, кат. № 1.3.5).
8. Диметилсульфоксид(ДМСО) (Sigma, США, кат. № D8779).

2. ПРОЦЕДУРА

2.1. Первый день эксперимента

1. Подготовьте рабочее боксовое помещение и кабинет биобезопасности согласно инструкциям по СТБ.
2. Снимитеклетки MDCK с поверхности культуральных флаконов, как описано в гл.1, и подсчитывают их количество в камере Горяева.
3. Внеситесуспензиюклеток в количестве 30 тысяч клеток в 100 мкл среды ДМЕМ в лунки 96-луночного планшета.

4. Приготовьте 10-кратные разведения исследуемого препарата в среде ДМЕМ
5. Внеситев лунки по 100 мклсоответствующего разведения препарата, используя не менее трех лунок на каждое разведение. В контрольные лунки внесите по 100 мкл среды ДМЕМ без препарата. Планшеты инкубируйте в CO_2-инкубаторе 24 –48 часов.

2.2. Второй день эксперимента

1. Приготовьте рабочий раствор МТТ с концентрацией 8 мкг/мл.
2. В лунки планшета, не сливая среду, внесите по 20 мкл раствора МТТ и оставьте на 4 часа в CO_2-инкубаторе.
3. Удалитесреду.
4. В лунки внесите по 200 мкл ДМСО, перемешайте содержимое и инкубируйте 5 минут.
5. Измерьтеоптическую плотность лунок при 570 нм.
6. Количество жизнеспособных клеток (%) подсчитайте по формуле:

$$100\ \% \times \frac{\text{ОП}_{\text{контроля}} - \text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{ОП}_{\text{контроля}}}$$

Расчеты параметров токсичности испытуемых веществ проводят, используя установленные в эксперименте значения максимальной переносимой концентрации (МПК). МПК – максимальная концентрация, которая еще не вызывает видимых цитодеструктивных изменений в культуре клеток. В экспериментах по определению цитотоксичности обычно за МПК принимают ½ от концентрации, не оказывающей влияния на жизнеспособность клеток.

ПРОТОКОЛ 2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ СКРИНИНГА ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

1. МАТЕРИАЛЫ

1. Флаконы для культивирования клеток 12,5 $см^2$ (БиолоТ, Россия, кат. № 5.10.12).
2. 96-луночные планшеты с V-образным дном для постановки РГА (Greinerbio-one, Германия, кат. № 651101).
3. Одно- и многоканальные пипетки от 1 мкл до 1000 мкл (Ленпипет, Россия).
4. CO_2-инкубатор (Heraeus, США).
5. Питательная среда для культивирования клеток ДМЕМ (БиолоТ, Россия, кат. № 1.3.5).
6. Сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия, кат. № 1.1.12).
7. Бычий сывороточный альбумин (БСА, 35 %-ный раствор) (Sigma, США, кат. № A7979).
8. TPCK-трипсин (Sigma, США, кат. № T-8642).
9. Раствор Хенкса (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия).
10. 1 %-ная суспензия эритроцитов петуха.
11. ФСБ

2. ПРОЦЕДУРА

2.1. Подготовка ростовой среды ДМЕМ с 10 %-ным содержанием сыворотки крупного рогатого скота (для субкультивирования клеток)

Приготовьте концентрированный раствор антибиотиков: во флакон с пенициллином добавьте 5 мл среды ДМЕМ (без сыворотки), после растворения содержимое флакона перенесите во флакон со стрептомицином, смесь пипетируйте до полного растворения, разлейте по 0,5 млв пробирки и храните при температуре не выше –20°С.

Для приготовления ростовой среды к 200 мл среды ДМЕМ добавьте 20 мл сыворотки из плодов крупного рогатого скота (10 %) и 0,22 мл концентрированного раствора антибиотиков.

2.2. Подготовка среды для размножения вируса (на 10 флаконов)

К 450 мл среды ДМЕМ добавьте 2,57 мл 35 %-ного раствора БСА. Непосредственно перед употреблением к 50 мл среды ДМЕМ (без сыворотки и с БСА) добавьте 50 мклТРСК-трипсина (конечная концентрация 2 мкг/мл). В подготовленную среду добавьте 50 мкл концентрированного раствора антибиотиков.

Примечание. Приготовление рабочей концентрации ТРСК-трипсина.10 гТРСК-трипсина растворите в 5 мл дистиллированной воды, стерилизуюйте фильтрованием, разлейте по 0,5 млв пробирки и храните в замороженном состоянии.

2.3. Определение $ТЦИД_{50}$

2.3.1. Первый день эксперимента

1. Подготовьте рабочее боксовое помещение и кабинет биобезопасности согласно инструкциям по СТБ.
2. Клетки MDCK снимите с поверхности культуральных флаконов и рассейте их на 96-луночные планшеты в количестве 3×10^4 клеток/лунку в 0,2 мл полной питательной среды ДМЕМ.
3. Инкубируйтев CO_2-инкубаторе 24 часа.

2.3.2. Второй день эксперимента

1. Приготовьте 10-кратные разведения тестируемого вируса на растворе Хенкса.
4. Удалите старую среду из планшета.
5. Промойтеклетки раствором Хенксадва раза, чтобы удалить остатки сыворотки.
6. Внеситев лунки по 100 мкл раствора с вирусом, начиная с разведения 10^{-10}(лунки А-Н 10) и заканчивая 10^{-1} (лунки А-Н 1) В контрольные лунки (А-Н 11-12) добавьте по 100 мкл раствора Хенкса без вируса.
7. Инкубируйте 30 минут в CO_2-инкубаторе.

8. Из планшета удалите вируссодержащий раствор и в каждую лунку внесите по 200 мкл среды.
9. Рассмотрите лунки планшета через 4 суток, отметьте лунки, в которых вирус вызвал цитопатический эффект, и рассчитайтеТЦИД$_{50}$ по методу Кербера или Рида – Менча(см. табл. 4, проттокол 2.1, гл. 3).

2.4. Тестирование противовирусной активности препарата

2.4.1. Первый день эксперимента

1. Вносите 5 мл суспензии клеток MDCK в концентрации 2×10^5 клеток/мл в каждый флакон.
2. Инкубируйте24 часа при +37°С в CO_2-инкубаторе.

2.4.2. Второй день эксперимента

1. Удалите старую среду и промойте монослой раствором Хенкса.
2. Внесите5 мл среды для размножения вируса с содержанием одной из тестируемых концентраций лекарственного препарата.
3. Контроли:1 флакон с вирусом без препарата (вирусный контроль), 1 флакон со средой для размножения вируса (контроль действия трипсина), а также 1 флакон со средой ДМЕМ без трипсина (контроль клеток).
4. Флаконы инкубируйте 60 минут в CO_2-инкубаторе.
5. Внеситепо 100 мкл вируса, разведенного до концентрации 100 ТЦИД$_{50}$ в половинуфлаконов, содержащихлекарственные препараты, и в вирусный контроль. Через 1 часинкубирования в CO_2-инкубаторе флаконы промойте, чтобы удалить несвязавшийся вирус, вносите свежую среду с лекарственными препаратами и инкубируйте при +37°С в течение 5 дней. В качестве положительного контроля включают амантадина гидрохлорид (25 мкг/мл) для вирусов гриппа А и рибавирин (10 мкг/мл) для вирусов гриппа А и В.

6. Ежедневно отбирают 50 мклкультуральной жидкости для измерения титра гемагглютинина в РГА.
7. Сравнитетитры вируса во флаконах с препаратами с вирусным контролем. Разницамежду титрами в РГА в 4 раза и более считается значимой.

ПРОТОКОЛ 4. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

1. МАТЕРИАЛЫ

1. 96-луночные плоскодонные планшеты (OrangeScientific, Бельгия, кат. № 5530100).
2. Целлюлозно-ацетатный мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, кат. № 430320).
3. Одно- и многоканальные пипетки от 1 мкл до 1000 мкл (Ленпипет, Россия).
4. CO_2-инкубатор (+37°C).
5. ИФА-ридер (BioRad, США).
6. Озельтамивиркарбоксилат, активная форма этилового эфира озельтамивир фосфата (Hoffmann-LaRoche, Швейцария).
7. Занамивир, препарат Relenza, (GlaxoSmithKlineplc, Великобритания).
8. Хлорид натрия – NaCI (Sigma, США, кат. № M5655).
9. Хлорид калия – KCI (Sigma, США, кат. № P9333).
10. Однозамещенный фосфат калия – KH_2PO_4 (Sigma, США, кат. № 229806).
11. Двузамещенныйфосфат натрия – $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ (Sigma, США, кат. № 71650).
12. Ацетон (ЗАО «Гальванит», Россия); Tween 20 (ICNBiomedicalsInc, кат. № 194841).
13. Физиологический раствор.

14. Сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия, кат. № 1.1.12).
15. Мышиные моноклональные антитела к вирусу гриппа типа А (CDC, кат. № VS 2525).
16. Моноклональныеантитела к вирусу гриппа В (Abbiotec, клон1D8/B1).
17. Пероксидазныйконъюгат аффинно-очищенных антител кролика против IgG мыши (ЗАО «Биосан», Россия).
18. Лимонная кислота (Sigma, США, кат. № 27488) или фосфатно-цитратный буфер с перекисью водорода (Sigma, США, кат. № Р 4560).
19. Ортофенилендиамин(Sigma, США, кат. № Р5412).
20. Питательная среда для культивирования клеток ДМЕМ (БиолоТ, Россия, кат. № 1.3.5).
21. Стоп-реагент (сернаякислота).

2. ПРОЦЕДУРА

2.1. Приготовление сток-раствора занамивира

1 доза препаратаРелензы содержит 5 мг порошка занамивира (М= 332,32) и 20 мг вспомогательного вещества лактозы. Содержимое 1 дозы растворите в 50,13 мл буфера, чтобы получить 300 мкМ раствор. Из этого раствора приготовьте десятикратные разведения.

2.2. Приготовление сток-раствора озельтамивира (GS4071)

300 мкМ раствор соединения GS4071 (М= 284,36) приготовьте путем добавления 4,266 мг к 50 мл ФСБ.

Все растворы ингибиторов необходимо хранить при температуре от +2 до+8°С. Сток-растворы хранятся 12 месяцев, а их разведения можно использовать в течение 6 месяцев. Рабочие концентрации ингибиторов, которые используют для скрининга лекарственной чувствительности вирусов гриппа invitro, – 0,01, 0,1 1, 10, 100, 1000 и 10000 нм.

2.3. Приготовление растворов для ИФА (расчет на четыре 96-луночных планшета)

1. 1 л ФСБ.
2. Раствор для фиксации, 80 %-ный ацетонна ФСБ: 10 мл ФСБ +40 мл ацетона.
3. Раствор для отмывки, физиологический раствор с 0,05 %Tween 20: 500 мл физиологического раствора + 250 мклTween 20.
4. ИФА-буфер, ФСБ + 0,1 %Tween 20 + 1 % ЭТС: 150 мл ФСБ + 150 мклTween 20 + 1,5 мл ЭТС.
5. Разведение моноклональных антител (МАТ) на ИФА-буфере.МАТ к вирусу гриппа А (1:1000): 45 мл ИФА-буфера + 45 мкл МАТ. МАТ к вирусу гриппа типа В (1:500): 45 мл ИФА-буфера + 90 мкл МАТ.
6. Раствор пероксидазногоконъюгата (1:5000):45 мл ИФА-буфера + 9 мклконъюгата.
7. Субстрат:

Таблица 6.

Объем (мл)	Лимонная кислота (мл)	Na_2HPO_4 (мл)	Деиониз. H_2O (мл)	H_2O_2 (мкл)	ОФД (мг)
25	6,1	6,4	12,5	50	10
37,5	9,15	9,6	18,75	75	15
50	12,2	12,8	25	100	20
65	15,9	16,6	32,5	130	26
75	18,3	19,2	37,5	15	30
90	22	23	45	180	36

Либо растворите одну таблетку фосфатно-цитратного буфера в 100 мл деионизованной воды (на 10 планшетов) и растворите 1 таблетку ОФД (10 мг) в 20 мл буфера.

Готовьте все растворы для ИФА непосредственно перед использованием и не храните!

2.3.1. Первый день эксперимента

1. Рассейтеклетки MDCK в 96-луночные планшеты из расчета 30000 клеток/лунку в 0,2 мл полной питательной среды.

2. Инкубируйте клетки 24 часа в CO_2-инубаторе.

2.3.2. Второй день эксперимента

1. Приготовьте 10-кратные разведения вируса на среде для размножения вируса.
2. Приготовьтеразведения исследуемых препаратов на среде для размножения вируса.

Примечание. Поскольку в лунку планшета сначала вносится 100 мкл питательной среды с препаратом, а потом еще 100 мкл среды (с препаратом или без препарата), то следует готовить концентрации препаратов, в два раза превышающие требуемые: например, для тестирования эффекта, который будет оказывать препарат в концентрации 10 мкг/мл, готовят рабочий раствор с концентрацией 20 мкг/мл.

3. Промойтеклеточный монослой в лунках средой без сыворотки.
4. Внеситепо 100 мкл разведений лекарственных препаратов и инкубируйте 2 часа в CO_2-инкубаторе. На каждом планшете обязательно оставляйте не менее четырех лунок в качестве контроля клеток и по четыре лунки на каждое из исследуемых разведений вируса (контроль вируса). В эти лунки вместо препарата добавьте среду для размножения вируса.
5. По истечении времени инкубации внесите по 100 мкл разведений вируса и оставьте на 18 –20 часов в CO_2-инкубаторе. В каждой серии опытов обязательно в качестве положительного контроля включайте рибавирин (10 мкг/мл).

   Примечание. При тестировании вновь выделенных штаммов вируса гриппа на лекарственную устойчивость к уже существующим препаратам параллельно тестируют заведомо чувствительный к действию исследуемых соединений штамм вируса гриппа.

2.3.3. Третий день эксперимента

1. Рассмотрите под микроскопом клеточный монослой и убедитесь в отсутствии следов цитотоксических и цитопатических изменений в контроле клеток.
2. Удалите среду из лунок многоканальной пипеткой. Внесите 80 %-ный ацетон на ФСБ в объеме 100 мкл/лунку и выдержите при комнатной температуре 15 минут.
3. Удалите фиксирующий раствор. Высушивайте планшеты под вытяжкой в течение 30 минут.
4. Отмойте фиксирующий растворотмывающим буфером 3 раза, внося по 200 мкл/лунку.
5. ВнеситеИФА-буфер в объеме 100 мкл/лунку.
6. Инкубируйтев термостате при +37°С в течение 35 минут, после чего буфер удалите.
7. Вноситеразведенные моноклональные антитела в объеме 100 мкл/лунку.
8. Инкубируйтев термостате при +37°С в течение 1 часа.
9. Планшеты отмойте 2 раза отмывающим буфером в объеме 200 мкл/лунку.
10. Внеситепероксидазныйконъюгат в объеме 100 мкл/лунку.
11. Инкубируйтев термостате при +37°С в течение 1 часа.
12. Промойте лунки отмывающим буфером 3 раза по 200 мкл/лунку.
13. Внеситесубстрат в объеме 100 мкл/лунку.
14. Выдерживайтепланшеты 10 – 30 минут в темноте до появления желтого окрашивания в лунках.
15. Для остановки реакции вносите стоп-реагент (1,8 М раствор серной кислоты) в объеме 50 мкл/лунку. Цвет жидкости в лунках изменяется на оранжевый.
16. Измерьтевеличину оптической плотности (ОП) на ИФА-ридере при длине волны 492 нм. Для одного разведения вируса требуется как минимум 4 лунки, для каждого разведения вычислите среднее значение

ОП. Зависимость ОП от концентрации вируса должна быть линейной.По этой причине необходимо подобрать такие условия эксперимента, при которых значения ОП для контроля клеток не должны превышать 0,2, а значения ОП для контроля вируса не должны быть выше 1,5.

Процент ингибирования вирусопродукции (ИВП) в зависимости от концентрации препарата определите по формуле:

$$\frac{ОП_{опыт} - ОП_{контроль\ клеток}}{ОП_{контроль\ вируса} - ОП_{контроль\ клеток}} \times 100\ \%$$

ПРОТОКОЛ 5. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕСТЕ АДСОРБЦИИ НЕЙТРАЛЬНОГО КРАСНОГО

Оценка жизнеспособности клеток по адсорбции ими нейтрального красного широко применяется в биомедицинских исследованиях. Метод основан на способности жизнеспособных клеток поглощать и накапливать суправитальный краситель нейтральный красный в лизосомах благодаря электростатическому притяжению. Повреждение лизосомальных мембран приводит к снижению накопления красителя, поэтому окрашивание пропорционально количеству жизнеспособных клеток.

1. МАТЕРИАЛЫ

1. 96-луночные плоскодонные планшеты (OrangeScientific, Бельгия, кат. № 5530100).
2. Целлюлозно-ацетатный мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, кат. № 430320).
3. Одно- и многоканальные пипетки от 1 мкл до 1000 мкл (Ленпипет, Россия).
4. CO_2-инкубатор (Heraeus, США).
5. ИФА-ридер (BioRad, США).

6. Нейтральный красный (Sigma, США, кат. № N4638).
7. Питательная среда для культивирования клеток ДМЕМ (БиолоТ, Россия, кат. № 1.3.5).

2. ПРОЦЕДУРА

2.1. Сток-раствор красителя

3,33 г нейтрального красного растворите в 1 л дистиллированной воды. Пропустите раствор через фильтровальную бумагу.

2.2. Раствор для экстракции красителя

Смешайте в равных объемах этанол и 0,1М$NH_4H_2PO_4$ (pH = 3,5).

2.3. Первый и второй дни эксперимента

Рассейте клетки MDCK в первый день эксперимента и внесите вирус и препарат во второй день эксперимента, как описано в пунктах 2.3.1. и 2.3.2 протокола 4, гл.4. При этом используйте структуру планшета, как показано на рис. 11.

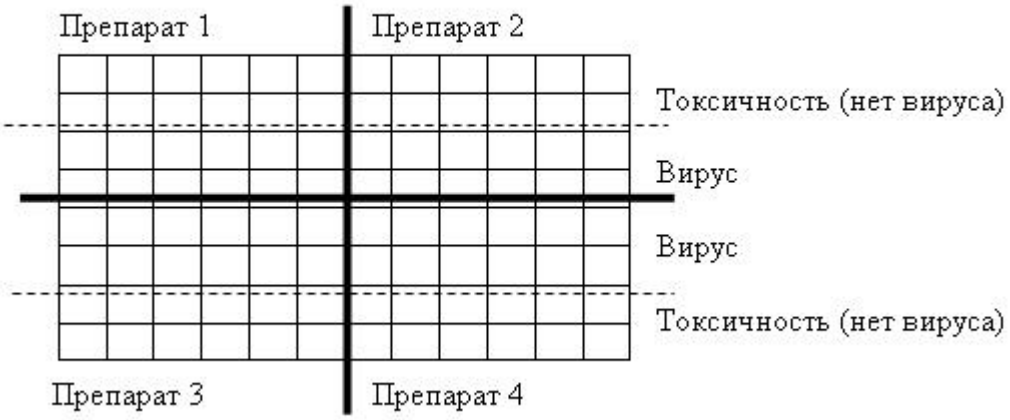


Рис. 11. Подготовка планшета для теста с нейтральным красным

2.4. Третий день эксперимента

1. Внесите соответствующий объем раствора нейтрального красного в полную питательную среду, с тем чтобы получить разведение 1:3(1 часть сток-раствора красителя на 2 части полной питательной среды).

Концентрация рабочего раствора нейтрального красного, таким образом, составит 1,11 мг/мл.

2. Не сливая питательной среды, при помощи многоканального дозатора добавте 50 мкл рабочего раствора нейтрального красного в каждую лунку планшета (финальная концентрация красителя – 0,22 мг/мл). Подготовленные планшеты поместите в CO_2-инкубатор на 1,5 часа.
3. Среду из планшетов удалите, перевернутые планшеты просушите фильтровальной бумагой.
4. В каждую лунку планшета внесите по 300 мкл ФСБ.
5. Вытряхните ФСБ из планшета, а остатки удалите при помощи постукивания по фильтровальной бумаге.
6. Еще раз промойте планшет ФСБ (см. п. 4, 5).
7. Вносите100 мкл раствора для экстракции красителя из клеток.
8. Планшеты оставьте на 30 – 90 минут при комнатной температуре.
9. Снимитепоказания на ИФА-ридере при длине волне 490 нм. Рассчитайте 50 %-ную ингибирующую и токсическую концентрации препаратов при помощи графиков. Графики стройте по средним значениям ОП для каждой группы из трех инфицированных или неинфицированных лунок с различными концентрациями лекарственного препарата. Для каждой концентрации препарата противовирусная активность (ПВА) рассчитывается как процент, на который ОП инфицированных клеток, обработанных препаратом, приближается к среднему ОП неинфицированных клеток при той же концентрации препарата.

$$\%\ \text{ПВА} = 100 \times \frac{\text{ОП}_{\text{инфицированных,обработанных препаратом}} - \text{ОП}_{\text{инфицированных,необработанных препаратом}}}{\text{ОП}_{\text{неинфицированных,обработанных препаратом}} - \text{ОП}_{\text{инфицированных,необработанных препаратом}}}$$

3. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Применение культур клеток является наиболее дешевым и быстрым методом оценки противовирусной активности соединений.

Основным критерием при изучении специфического противовирусного действия соединений является величина химиотерапевтического индекса (ХТИ), которая рассчитывается по формуле:

$$\text{ХТИ} = \frac{\text{ЦК}_{50}}{\text{ЭК}_{50}},$$

где $ЦК_{50}$ – это концентрация препарата, которая вызывает цитотоксический эффект в 50 % культивируемых клеток, а $ЭК_{50}$ – это минимальная концентрация препарата, которая эффективно ингибирует вирус-индуцируемые цитопатические изменения на 50 %.

Максимально переносимой концентрацией препарата (МПК), нетоксичной для клеток, обычно считают ½ от концентрации, не оказывающей влияние на жизнеспособность клеток.

Оптимальный срок контакта изучаемого соединения с культурой клеток при определении максимально переносимой концентрации (МПК) соответствует периоду максимального функционирования клеточных культур (в среднем 4 суток). Выраженную активность проявляют соединения, у которых снижение титра вируса при действии МПК вещества составляет не менее 2,0 lg, подавление репродукции вируса в условиях опыта – на 1,25 –2,0 lg и ХТИ равный 10 и больше. Такие соединения можно считать перспективными для дальнейших исследований в опытах на животных.

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСА ГРИППА*

ПРОТОКОЛ 1. ОТ-ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА МАТРИКСНОГО БЕЛКА ВИРУСОВ ГРИППА А

1. МАТЕРИАЛЫ

1. Набор для выделения вирусной РНК QIAamp®Viral RNA MiniKit (QIAGEN®, кат. № 52904, илидругие наборы для выделения вирусной РНК).
2. Набор для одностадийной ОТ-ПЦР OneStep RT-PCR (QIAGEN®, кат. № 210212).
3. Ингибитор РНКазыRNAseinhibitor в концентрации 20 ед./мкл (AppliedBiosystems, кат. № N8080119).
4. Вода без РНКазы (RNase-freewater).
5. Этиловый спирт (96 –100 %).
6. Микроцентрифуга (со скоростью вращения ротора до 13000 об/мин).
7. Пипетки переменного объема (10, 20, 100 и 200 мкл).
8. Стерильные наконечники без РНКазы для дозаторов с аэрозольным барьером.
9. Вортекс.
10. Микроцентрифужные пробирки (0,2 мл и 1,5 мл).
11. Термоциклер (устройство для постановки ПЦР).
12. Наборы праймеров.
13. Положительный контроль.

Таблица 7.Последовательности праймеров

Тип/субтип	Фрагмент гена	Праймер	Последовательность
Грипп типа А	Матрица (М)	M30F2/08	ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG
		M264R3/08	TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG

Ожидаемый размер продуктов амплификации – 244 п.о.

* Протоколы разработаны в СЦ ВОЗ по гриппу (Атланта, США)

2. ПРОЦЕДУРА

2.1. Выделение РНК

Выделите вирусную РНК из пробы с помощью набора для выделения вирусной РНК QIAampViral RNA MiniKit или другого аналогичного набора для выделения РНК в соответствии с инструкцией производителя.

2.2. Проведение одностадийной ОТ-ПЦР

.

1. Подготовьте рабочее боксовое помещение и кабинет биобезопасности согласно инструкциям по СТБ
2. Достаньте реагенты из морозильной камеры и оставьте их при комнатной температуре. После размораживания храните их на льду.
3. Приготовление матриксной смеси (работайте на льду): внесите в пробирки для микроцентрифуги ингредиенты, перечисленные в табл. 8, и аккуратно перемешайте путем десятикратного пипетирования матриксной смеси.

Таблица 8.Реакция без раствора Q

Реагент	Объем (мкл)
Вода (для молекулярно-биологических исследований)	9,5
Буферный раствор QIAGEN® 5x для ОТ-ПЦР	5,0
Смесь дНТФ (содержащая 10 ммоль каждого дНТФ)	1,0
Прямой праймер (10 мкмоль/л)	1,5
Обратный праймер (10 мкмоль/л)	1,5
Смесь ферментов QIAGEN® для одностадийной ОТ-ПЦР (5 ед./мкл)	1,0
Ингибитор РНКазы (20 ед./мкл)	0,5
Общий объем	**20,0**

Примечание. Для предупреждения даже минимальных различий в концентрации солей очень важно тщательно перемешать растворы перед использованием.

4. Внесите по 20 мкл матриксной смеси в каждую пробирку для ПЦР.
5. Добавьте к матриксной смеси 5 мкл экстрагированной из пробы РНК. Для постановки контролей используйте 5 мкл дистиллированной воды

для отрицательного контроля и 5 мкл соответствующих вирусных РНК положительного контроля.

6. Запрограммируйте термоциклер в соответствии с условиями термоциклирования.
7. Не убирая пробирки для постановки ПЦР со льда, запустите программу постановки ОТ-ПЦР. Подождите, пока температура в термоциклере достигнет +50°С. Затем поместите пробирки для постановки ПЦР в термоциклер.

Таблица 9.Условия термоциклирования

Тип цикла	Температура (°С)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
Обратная транскрипция	50	30:00	1
Начальная активация ПЦР	95	15:00	1
Трехстадийный цикл:			
Денатурация	94	0:30	45
Отжиг праймеров	50	0:30	
Синтез копии фрагментов	72	1:00	
Заключительный синтез	72	10:00	1

2.3. Электрофорез продуктов ОТ-ПЦР в агарозномгеле

Приготовьте агарозныйгель, внесите продукты ПЦР и маркер молекулярной массы и проведите электрофорез в соответствии со стандартными протоколами. Определите расположение маркера с помощью УФ-лучей. Ниже приведены перечень необходимых материалов и описание процедуры.

2.3.1. Материалы

1. Планшет для агарозногогеля и камера для проведения электрофореза.
2. Источник электрического тока и электроды.
3. Источник УФ-излучения (λ = 302 нм).
4. Цифровая система для регистрации процедуры электрофореза в геле.
5. Пипетки переменного объема.
6. 2 %-ный гель агарозы в буферном растворе 1 × ТАЕ.
7. Буферный раствор 1 × ТАЕ.
8. Раствор бромистого этидия (10 мг/мл).

9. Буферный раствор для геля (6 × GLB).
10. Маркер молекулярной массы.

2.3.2. Процедура

1. Приготовление агарозногогеля:
   а) поместите планшет для агарозногогеля на заливочный столик. Поместите в планшет гребенку и установите подставку строго горизонтально;
   б) приготовьте 2 %-нуюагарозу, взвесив 4 г порошка агарозы и расплавив его в 200 мл буферного раствора 1 ×TAE. Расплавьте агар с помощью нагревания в микроволновой печи;
   в) охладите расплавленную агарозу примерно до +60°C, затем добавьте 10 мкл раствора бромистого этидия;
   г) вылейте расплавленную агарозу в планшет для геля;
   д) оставьте гель при комнатной температуре до его застывания;
   е) удалите гребенку из рамки планшета;
   ж) поместите планшет в камеру электрофореза так, чтобы лунки располагались со стороны катода;
   з) налейте в камеру буферного раствора 1 × TAE так, чтобы он покрыл поверхность геля.
2. Внесение проб:
   а) добавьте 5 мкл буферного раствора для геля в каждую пробирку для ПЦР;
   б) внесите маркер молекулярной массы в первую лунку в агарозномгеле;
   в) внесите пипеткой 15 мкл продукта ПЦР/ буферного раствора GLB в гель;
   г) закройте камеру крышкой и подсоедините электроды. Проведите электрофорез в геле в течение 30 – 35 минут при напряжении 100 В;

д) рассмотритерасположение маркера и полосок продуктов ПЦР с помощью УФ-лучей;

е) задокументируйте картину электрофореза в геле с помощью фотокамеры.

2.3.3. Интерпретация результатов

Сравните размеры полученных продуктов ПЦР с ожидаемым размером продуктов. Исследования должны всегда проводиться с положительным контролем.

ПРОТОКОЛ 2. ОДНОСТАДИЙНАЯ ОТ-ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА A(H1N1)pdm09

1. МАТЕРИАЛЫ

1. Материалы такие, как перечислены в пп. 1-9 в протоколе 1 гл. 5.
2. Термоциклер (система для постановки ПЦР GeneAmp 9700, AppliedBiosystems или 96-луночный термоциклерVeriti, AppliedBiosystems).
3. Положительный контроль (вирус свиного гриппа A A/SW/HK/PHK1578/03 или A/California/04/2009) (по запросу может быть получен из Гонконгского университета).
4. Набор праймеров (см. табл. 10).

Таблица 10.Праймеры

Тип/субтип	Фрагмент гена	Праймер	Последовательность
Вирус гриппа A/H1N1 – 2009	HA	HKU-SWF	GAGCTCAGTGTCATCATTTGAA
		HKU-SWR	TGCTGAGCTTTGGGTATGAA

Ожидаемый размер: 173 п.о.

2. ПРОЦЕДУРА

1. Подготовьте рабочее боксовое помещение и кабинет биобезопасности согласно инструкциям по СТБ.

2. Выделите вирусную РНК из пробы с помощью набора QIAampViral RNA MiniKit или другого аналогичного набора для выделения РНК в соответствии с инструкцией производителя.
3. Приготовьте матриксную смесь для ОТ-ПЦР, как описано ниже в табл. 11.

Таблица 11.

Реагент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
Вода (для молекулярно-биологических исследований)	7,4	
Буферный раствор для ПЦР 5х (набор)	4,0	1Х
дНТФ (набор)	0,8	400 мкМ каждого дНТФ
Праймер 5 мкМ: HKU-SWF	2,4	0,6 мкМ
Праймер 5 мкМ: HKU-SWR	2,4	0,6 мкМ
Ингибитор РНКазы (20ед./мкл)	0,2	4 ед.
Смесь ферментов (набор)	0,8	–
Общий объем	**18,0**	

4. Внесите по 18 мкл матриксной смеси в каждую пробирку.
5. Добавьте 2 мкл очищенной РНК.
6. Задайте условия ОТ-ПЦР, как описано в табл. 12.

Таблица 12.

Стадия	Температура (°С)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
Обратная транскрипция	50 95	30:00 15:00	1
Денатурация Отжиг праймеров Синтез копии фрагментов	 94 57 72	 0:30 0:30 0:20	} 40
Синтез копий фрагментов после ПЦР	72	7:00	1
Стадия после прогона	4	α	

7. Приготовьте 2 %-ный гель агарозы, внесите продукты ПЦР и маркеры молекулярной массы и проведите электрофорез в соответствии со стандартными протоколами. Определите расположение маркера и полосок продуктов ПЦР с помощью УФ-лучей.

3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ожидаемый размер продуктов ПЦР для гриппа – H1 – 173 п.н. Этот анализ позволяет специфически выявлять пробы, содержащие вирус

A(H1N)pdm2009, но не выявляет пробы, содержащие вирус гриппа человека A/H1N1 предшествующихпандемии сезонов.

ПРОТОКОЛ 3. ДВУХСТАДИЙНАЯ ОТ-ПЦР

При низкой вирусной нагрузке в пробеиспользуется «оптимизированный» протокол двухстадийной ПЦР.

1. СТАДИЯ ОТ

Таблица 13.

Тип	Праймер	Последовательность
Грипп А	uni12W	AGCRAAAGCAGG
Грипп В	Buni11W	AGCAGAAGCGS

Для постановки реакции на 40 мкл см. табл. 14.

Таблица 14.

Реагент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
Вода (для молекулярно-биологических исследований)	12,1	
Буферный раствор 5х*	8,0	
DTT (0,1М)*	2,0	
РНКзин	2,0	
дНТФ(100 ммоль)	0,9	По 25 мм каждого дНТФ
Uni12W или Buni 11W (30 мкмоль/л)	3,0	
SS III RT	2,0	
Матричная РНК	10,0	
Общий объем	**40,0**	

1.1. Метод

Смешайте праймер и матрицу в тонкостенной пробирке и инкубируйте при +65°С 5минут. Удалите от источника тепла (DNAEngine) и оставьте охлаждаться до комнатной температуры. Центрифугируйте в течение очень короткого времени , сразу добавьте 27 мкл реакционной смеси, затем перемешайте и центрифугируйте в течение очень короткого времени, амплифицируйте в соответствии с программой (табл. 15).

Таблица 15.

* Поставляется вместе с SS III RT.

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)
25	5:00
50	60:00
70	15:00

2. СТАДИЯ ПЦР

Для постановки реакции на 50 мкл см. табл. 16.

Таблица 16.

Реагент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
Вода (для молекулярно-биологических исследований)	35,1	
Буферный раствор 10x*	7,5	
$MgSO_4$*	1,0	
дНТФ (100 мм)	0,9	По 25 ммоль каждого дНТФ
Прямой праймер (10 мкмоль/л)†	1,5	
Обратный праймер (10 мкмоль/л)†	1,5	
Pfx-полимераза	0,5	Invitrogen, кат. № 11708-.039
Продукт RT	2,0	
Общий объем	**50,0**	

3. ПРОЦЕДУРА

Смешайте праймеры и матрицу в тонкостенной пробирке, затем добавьте 45 мкл реакционной смеси. Перемешайте и центрифугируйте в течение очень короткого времени и затем амплифицируйте (табл. 17).

Таблица 17.

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
94	10:00	1
55	5:00	1
68	2:00	1
94	0:05	
55	0:05	} 39
68	2:00	
94	0:05	1
55	0:05	1
68	10:00	1
4	Удержание	

3.1. Анализ продуктов

* Поставляется вместе с Pfx-полимеразой.

† См. выше о парах праймеров в зависимости от амплифицируемого типа/субтипа.

Проводите анализ 5 мкл каждой пробы в 0,8 %-ном агарозномгеле, приготовленном на буферном растворе TBE 1x и содержащем краситель GelRed (Biotium, кат. № 41003-1) в соответствии с инструкцией производителя.

Реакции должны давать одиночные полосы и не требуют очистки геля.

3.2. Очистка продукта

Прежде чем вы начнете секвенирование гена, необходимо удалить реагенты, применявшиеся для ОТ-ПЦР. Это лучше всего сделать с помощью колонки/элюции (набор для очистки плазмидной ДНК и полос геля illustra GFX PCR DNA gelbandpurificationkit, кат.№ 28-9034-70). Следуйте инструкции производителя, но промывайте продукты в дважды объемом500 мкл.

Для целей секвенирования продукты обычно элюируются либо с использованием 50 мкл воды (QIAGEN®, кат. № 129114), либо «розового» элюирующего буфера, поставляемого вместе с набором GE Healthcarekit.

3.3. Количественное определение продуктов

Полученное количество ДНК измеряется с использованием набора GeneQuantpro (кат. № 80-2114-98).На одну реакцию секвенирования используется эквивалент 100 – 200 нг ДНК.

3.4. Секвенирование генов

Проводится с использованием наборов для секвенирования ABI BigDye®Terminator v1.1 CycleSequencingkits (AppliedBiosystems, кат. № 4336774) и капиллярных секвенаторов (MegaBACE 1000 или ABI 3700).

ПРОТОКОЛ 4. ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ПРОТОКОЛ 4.1. ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ НА ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ МАТРИКСНЫЙ БЕЛОК ВИРУСОВ ГРИППА А

Выделите вирусную РНК из пробы клинического материала с помощью набора для выделения вирусной РНК QIAampViral RNA MiniKit или другого

аналогичного набора для выделения РНК в соответствии с инструкцией производителя.

1. МАТЕРИАЛЫ

1. Буферный раствор I для ПЦР (10x PCR buffer I) с содержанием 15 ммоль/л $MgCl_2$(AppliedBiosystems,кат. № 4379876).
2. Случайный гексамер в концентрации 50 мкмоль/л (AppliedBiosystems, кат. № 8080127).
3. Обратная транскриптаза MuLV в концентрации 50 ед./мкл (AppliedBiosystems, кат. № 8080018).
4. Ингибитор РНКазы в концентрации 20 ед./мкл (AppliedBiosystems, кат. № 8080119).
5. НаборLightCycler® – FastStart™ DNA Master HybProbe (Roche Applied Sciences, кат. № 03 003 248 001).
6. Праймеры и зонды, рабочая смесь которых готовится путем добавления равных объемов шести компонентов из табл. 18.

Таблица 18.

Тип /субтип	Фрагмент гена	Праймер	Последовательность
Грипп типа А	Матрица (М)	FLUAM-1F	AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA (10 мкмоль/л)
		FLUAM-2F	CATTGGGATCTTGCACTTGATATT (10 мкмоль/л)
		FLUAM-1F	CAA AGCGTCTACGCTGCAGTCC (10 мкмоль/л)
		FLUAM-2F	AAACCGTATTTAAGGCGACGATAA (10 мкмоль/л)
		FLUA-1P	5'-(FAM)-TTTGTGTTCACGCTCACCGT-(TAMRA)-3' (5 мкмоль/л)
		FLUA-2P	5'-FAM)-TGGATTCTTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCA-(TAMRA)-3 (5 мкмоль/л)

2. ПРОЦЕДУРА

1. Приготовьте матриксную смесь для обратной транскрипции, как описано в табл. 19.

Таблица 19.

Реагент	Объем (мкл)
Буферный раствор I для ПЦР 10x с содержанием	2,0

15 ммоль/л $MgCl_2$	
Дополнительный раствор $MgCl_2$ в концентрации 25 ммоль/л	2,8
Раствор дНТФ (2,5 ммоль/л)	8,0
Случайный гексамер в концентрации 50 мкмоль/л	1,0
Ингибитор РНКазы в концентрации 20 ед./мкл	1,0
Обратная транскриптаза в концентрации 50 ед./мкл	1,0
Общий объем	**15,8**

2. Добавьте 4,2 мкмоль вирусной РНК к вышеописанной смеси.
3. Перемешайте смесь на вортексе и центрифугируйте пробирку со смесью в течение очень короткого времени (≈ 3 секунды).
4. Оставьте пробирку при комнатной температуре на 10 минут и затем инкубируйте при +42°С 15 минут.
5. Инкубируйте пробирку при +95°С в течение 5 минут и затем охладите во льду.
6. Приготовьте матриксную смесь для ПЦР в режиме реального времени, как описано в табл. 20.

Таблица 20.

Реагент	Объем (мкл)
Вода для молекулярно-биологических исследований)	7,6
Раствор $MgCl_2$ (25 ммоль/л)	2,4
Смесь праймеров и зондов	3,0
Реакционная смесь для горячего старта HotStart*	2,0
Общий объем	**15,0**

7. Добавьте 5 мклкДНК к вышеописанной смеси.
8. Проведите ОТ-ПЦР в режиме реального времени в соответствии с условиями, изложенными в табл. 21.

Таблица 21.

Стадия	Температура (°С)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
Начальная активация ПЦР	95	10:00	1
Денатурация	95	0:10	50
Отжиг	56	0:15	
Синтез копии фрагментов	72	0:10	
Охлаждение	40	0:30	1

***** Готовьте смесь для горячего старта HotStart в соответствии с инструкцией к набору RocheLightCycler – FastStart DNA MasterHybProbes.

2.1. Анализ данных

1. По окончании процедуры щелкните мышью на «Finish».
2. Щелкнитемышьюна«Analysis»в Global Toolbar ивыберите Absolute Qualification of Analysis type дляанализаданных.
3. Выберите канал 530 и номер канала 640 из настройки каналов, чтобы считать результаты.

ПРОТОКОЛ 4.2. ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНА H1 ВИРУСА A(H1N1)pdm09

1. МАТЕРИАЛЫ

1. Мини-набор для выделения вирусной РНКQIAampViral RNA MiniKit (QIAGEN®, кат. № 52904).
2. Система ПЦР в режиме реального времени 7500 Real-Time PCR System(AppliedBiosystems).
3. Системадляодностадийной qОТ-ПЦР Invitrogen SuperScript® III Platinum® one-step qRT-PCR System (кат. № 11732.088).
4. Праймеры и зонды (табл. 22).

Таблица 22.

Тип /субтип	Фрагмент гена	Праймер	Последовательность
Вирус гриппа A/H1N1pmd2009	HA	swlH1F	GACAAAATAACAAACGAAGCAACTGG
		swlH1R	GGGAGGCTGGTGTTTATAGCACC
		swlH1P*	GCATTCGCAA»t»GGAAAGAAATGCTGG

2. ПРОЦЕДУРА

1. Выделите вирусную РНК из пробы клинического материала с помощью мини-набора для выделения вирусной РНК QIAampViral RNA MiniKit или другого аналогичного набора для выделения РНК в соответствии с инструкцией производителя.
2. Приготовьте матриксную смесь для ОТ-ПЦР, как описано в табл. 23.

* Символ «t» внизу означает позицию гасителя. Необходимо пометить зонды на 5'-конце молекулой-репортером 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) и загасить внутренне на модифицированном «t» остатке с помощью BHQ1, а также пометить терминальным фосфатом на 3'-конце, чтобы предотвратить достройку зонда за счет ДНК-полимеразы.

Таблица 23.

Реагент	Объем (мкл)	Конечная концентрация
Вода (для молекулярно-биологических исследований)	5,5	
Матриксная смесь для ПЦР 2x[*†]	12,5	5x
Прямой праймер	0,5	40 мкМ
Обратный праймер	0,5	40 мкМ
Зонд	0,5	10 мкМ
Полимеразная смесь ОТ/ДНК	0,5	
Общий объем матриксной смеси	**20,0**	
РНК-матрица	5,0	
Общий объем реакционной смеси	**25,0**	

3. Приготовьте матриксную смесь для необходимого количества проб (не забудьте приготовить большее количество смеси, чем необходимо, с учетом потерь при пипетировании).
4. Приготовьте 20 мклаликвоты этой смеси и добавьте соответствующую РНК-матрицу. Центрифугируйте планшеты/пробирки в течение очень короткого времени (не более 3”), загрузите термоциклера и запустите программу термоциклирования (табл. 24).

Таблица 24.

Стадия	Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
Обратная транс-крипция и акти-вация Taq	50 95	30:00 02:00	1
ПЦР	95 55	0:15 00:30[‡]	} 45

2.1. Анализ данных

1. По окончании процедуры щелкните мышью на «Finish».
2. Щелкнитемышьюна «Analysis» в Global Toolbar ивыберите Absolute Qualification of Analysis type дляанализаданных.
3. Выберите канал 530, чтобы считать результаты.

[*] Поставляется в наборе Invitrogen.
[†] К матриксной смеси необходимо добавить референсный краситель ROX (поставляется вместе с набором Invitrogen) в количестве, рекомендованном производителем.
[‡] Данные флуоресценции (FAM) собираются на этапе инкубирования при +55°C.