

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет»

*И.Я. Строганова*

**ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ  
ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ**

*Методические указания к лабораторным занятиям*

Красноярск 2018

*Рецензент*  
*В.А. Колесников, д-р вет. наук, профессор*

**Строганова, И.Я.**

**Принципы диагностики вирусных болезней животных:** метод. указания к лабораторным занятиям / И.Я. Строганова; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2018. – 43 с.

Включают в себя описание долабораторной (клинико-эпизоотологической) и лабораторной диагностики, получения биологического материала, экспресс-методов и длительных методов исследования.

Предназначено для студентов очного и заочного отделений Института ПБиВМ специальности 36.05.01 «Ветеринария», дисциплина «Ветеринарная вирусология и биотехнология», модульная единица 3 «Общая вирусология», направление подготовки 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза», дисциплина «Вирусология», модульная единица 1 «Общая вирусология», направление подготовки 06.03.01 «Биология», дисциплина «Вирусология», модульная единица 1 «Общая вирусология».

Печатается по решению редакционно-издательского совета  
Красноярского государственного аграрного университета

© Строганова И.Я., 2018  
© ФГБОУ ВО «Красноярский государственный  
аграрный университет, 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.....	7
1.1. Общие правила.....	7
1.2. Получение биоматериала от больных животных.....	9
1.3. Получение биоматериала от павших или вынужденно уби- тых животных.....	11
1.4. Правила отбора биологического материала от животных для исследования на вирусно-бактериальные инфекции молод- няка крупного рогатого скота.....	11
1.5. Направление в лабораторию.....	14
2. ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕС- КОГО МАТЕРИАЛА.....	15
2.1. Обнаружение вирусных антигенов.....	15
2.2. Обнаружение вирионов.....	20
2.3. Обнаружение вирусных нуклеиновых кислот.....	21
2.3.1. Метод ДНК-зондов.....	21
2.3.2. Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции).....	22
2.4. Обнаружение вирусных телец-включений.....	23
2.5. Обнаружение вирусных гемагглютининов.....	25
2.6. Диагностическое значение экспресс-методов.....	26
3. ДЛИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИ- ЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.....	27
3.1. Индикация вирусов в биологическом материале методом биологической пробы.....	27
3.2. Выделение (изоляция) вирусов, обнаруженных биопробой.	33
3.3. Идентификация выделенных вирусов.....	34
3.4. Доказательство этиологической роли выделенного вируса..	37
4. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ.....	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	39
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	40
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	41

## ВВЕДЕНИЕ

*Диагноз* (от греч. *diagnosis* – распознавание) – это определение характера и существа болезни, установление ее причины и формы. Поставить диагноз – значит определить, распознать болезнь. Раздел медицины и ветеринарии, изучающий принципы и методы распознавания болезней, называют *диагностикой*.

Система мероприятий, направленных на борьбу с инфекционными болезнями, обычно включает профилактику, диагностику и лечение. В системе же мероприятий по борьбе с вирусными инфекциями в настоящее время отсутствует лечение, так как специфических противовирусных препаратов практически еще не разработано, несмотря на огромные усилия, прилагаемые для этого. Поэтому удельный вес диагностики в борьбе с вирусными болезнями значительно выше, чем с инфекционными болезнями невирусной этиологии.

Быстро и правильно поставленный диагноз позволяет принять целенаправленные меры по ликвидации возникшей вспышки вирусной болезни, а также может послужить основой для оценки эпизоотологической ситуации. Ошибочный же диагноз или задержка с его постановкой могут повлечь за собою распространение вспыхнувшей болезни, усложнение мероприятий по ее ликвидации и, как следствие, значительные экономические потери. Это особенно касается вспышек быстро распространяющихся (ящур) или тяжело протекающих (чума свиней) инфекций. Поэтому диагноз на вирусное заболевание должен быть поставлен как можно быстрее и как можно точнее. К сожалению, эти два требования нередко являются взаимоисключающими, так как чем быстрее поставлен диагноз, тем он менее точный и наоборот.

Нет двух вирусов с абсолютно одинаковыми свойствами, нет и двух одинаковых вирусных болезней. Поэтому для диагностики почти каждой вирусной болезни требуется свой комплекс диагностических методов и препаратов. Тем не менее в подавляющем большинстве случаев вирусные болезни животных удается диагностировать, используя типовые (стандартные) принципы и методы диагностики. На этом основании можно сформулировать некоторые общие принципы диагностики вирусных болезней животных.

Как правило, постановка диагноза на вирусные болезни состоит из двух этапов:

1) клинико-эпизоотологическая диагностика, проводимая непосредственно в хозяйстве и большей частью позволяющая поставить лишь предварительный диагноз;

2) лабораторная диагностика, проводимая обычно в специализированной лаборатории и позволяющая поставить окончательный диагноз.

### **Долабораторная (клинико-эпизоотологическая) диагностика**

Это распознавание болезни на основе сбора, сопоставления и анализа сведений о больных животных. Такие сведения можно получить непосредственно в хозяйстве, где содержат животных:

а) клинические симптомы болезни;

б) патолого-анатомические изменения в органах больных животных;

в) эпизоотологические данные о появившейся болезни.

Клиническими симптомами болезни называют ее признаки, обнаруживаемые при клиническом обследовании больного. Они включают изменения (по сравнению с нормой) температуры тела, частоты и формы дыхания, пульса, аппетита, поведения, состояния кожи и слизистых оболочек, состояния и функционирования органов пищеварения, выделений и т. д.

Патолого-анатомические изменения обычно устанавливают при вскрытии павших или вынужденно убитых животных. К ним относят макроскопически наблюдаемые изменения (по сравнению с нормой) формы, размеров, цвета, консистенции, положения органов животного, а также появление узелков, кровоизлияний, везикул и других образований, не встречающихся в норме. Сюда же относят и микроскопические изменения в клетках и тканях, обнаруживаемые гистологическими методами.

Эпизоотологические данные включают сведения о скорости распространения болезни среди данного поголовья животных и на прилегающей территории, видах заболевших животных; динамике выявления больных и т. д.

Полученных данных обычно бывает достаточно, чтобы решить

вопрос, инфекционное или неинфекционное заболевание. Если оно инфекционного характера, то внимательный анализ и сопоставление собранных сведений позволяют предположить, какое именно. Следует также учитывать, что каждое заболевание (вирусной и невирусной этиологии) сопровождается определенным комплексом характерных клинических симптомов, эпизоотологическими особенностями и патолого-анатомическими изменениями.

Такой клинико-эпизоотологический диагноз в редких случаях носит полностью уверенный характер. Чаще всего он является лишь предварительным, ориентировочным. Особенно это относится к инфекционным болезням вирусной этиологии, когда сходные эпизоотологические данные, клинические симптомы и патолого-анатомические изменения обычно наблюдают при нескольких заболеваниях, и это обстоятельство не позволяет с абсолютной уверенностью распознать болезнь. Положение еще больше осложняется, если болезнь вызвана не одним, а двумя и более этиологическими агентами (например, двумя вирусами или вирусом и бактерией), что встречается часто.

Все же бывают редкие случаи, когда по клиническим, эпизоотологическим и патолого-анатомическим данным можно поставить уверенный диагноз. Так, если болезнь поражает сразу целые стада крупного рогатого скота и свиней, но не лошадей, очень быстро распространяется по территории, вызывая у животных появление афт во рту и слюнотечение, а также поражение межкопытной щели, и заканчивается в основном выздоровлением, можно уверенно считать, что налицо вспышка ящура (остается выяснить тип и вариант возбудителя).

Несмотря на сугубо ориентировочный характер предварительного диагноза, он играет весьма важную роль, так как может быть поставлен в короткий срок и сразу же ориентирует ветеринарных специалистов только на несколько видов болезней из многих возможных.

### **Лабораторная диагностика**

Для постановки окончательного диагноза в большинстве случаев необходимо в дополнение к предварительному клинико-эпизоотологическому диагнозу установить, какие патогенные вирусы находятся в организме больного животного, и попытаться найти доказатель-

ства их этиологической роли. Обнаружение и идентификацию вирусов в организме больного животного осуществляют лабораторными методами, их часто называют лабораторной диагностикой.

Она включает следующие основные виды работ:

- а) получение биологического материала;
- б) исследование биологического материала методами быстрой диагностики (экспресс-диагностика);
- в) исследование биологического материала длительными методами (ретроспективная диагностика);
- г) исследование парных сывороток в серологических реакциях (серологическая диагностика).

## **1. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

Обнаружение вируса в организме больного животного начинают с взятия биологического материала. Это различные ткани, жидкости, экскреты, полученные из организма больного животного с целью обнаружения в них и последующей идентификации возбудителей болезни, что составляет основу для постановки диагноза. Если возбудителем болезни является вирус, то после обнаружения его выделяют из биологического материала, устанавливают вид и доказывают его этиологическую роль в заболевании животного.

Максимальное содержание вирусов в биоматериале бывает в период появления первых симптомов болезни. Поэтому, чем раньше взяты пробы материала, тем больше шансов на обнаружение в них и выделение вирусов. Это относится и к трупному материалу, выделить вирус из которого редко удается, если смерть наступила через 7–9 дней или позже после появления клинических симптомов болезни.

### **1.1. Общие правила**

**А.** Материал должен быть взят стерильно, так как попадание грибков или бактерий (а также их спор) сильно затруднит или сделает невозможным последующее обнаружение в нем вирусов. Происходит это потому, что грибки и бактерии в процессе жизнедеятельности выделяют ферменты, разрушающие (лизирующие) биологический субстрат, в котором они находятся, и вместе с субстратом разрушают и вирусные частицы. Применять для подавления микрофлоры антисеп-

тические средства невозможно, поскольку большинство из них полностью инактивирует и вирусы. Чтобы хоть как-то противостоять разрушительному действию грибков и бактерий, пробы биологического материала можно погружать в стабилизирующую среду, состоящую из изотонического раствора с нейтральным рН, белка и антибиотиков. В качестве изотонического раствора можно использовать 0,85 %-й раствор хлористого натрия, раствор Хэнкса или раствор Эрла, а также среду № 199 или среду с гидролизатом лактальбумина. В качестве белка обычно добавляют 10 % нормальной прогретой сыворотки крови или бычьего альбумина (можно использовать и обезжиренное молоко). Антибиотики обычно добавляют в виде комплекса, состоящего из пенициллина (200–1 000 Ед/мл); стрептомицина (200–1 000 мг/мл) и нистатина (50–100 Ед/мл). Стабилизирующая среда сдерживает бактериальный рост. Правила асептики при взятии патологического материала надо соблюдать, даже если материал сам по себе не может быть стерильным (например, фекалии), чтобы предотвратить внесение посторонней микрофлоры.

**Б.** Количество биологического материала должно быть достаточным для обнаружения в нем вируса, но не превышать 10–20 г (за исключением случаев подозрения на бешенство, когда берут в лабораторию всю голову животного, а мелкое животное целиком).

**В.** Биологический материал берут только стерильными инструментами и помещают в стерильные пробирки (сухие или содержащие стабилизирующую среду) под резиновые пробки, которые можно заменить стерильными флаконами из-под антибиотиков.

**Г.** Взятый биологический материал необходимо тотчас (в течение нескольких минут) надежно законсервировать, чтобы предохранить содержащиеся в нем вирусы от инактивирующего действия ферментов и других агентов, а также защитить от действия физических факторов среды. Лучшим способом консервации является глубокое замораживание. Для этого пробирки или флакончики из-под антибиотиков с биологическим материалом, закрытые резиновыми пробками, надо поместить в термос (любого назначения) с охлаждающей смесью. В качестве охлаждающей смеси можно взять смесь равных частей сухого льда (твердой углекислоты) и этилового спирта (температура  $-71\text{ }^{\circ}\text{C}$  держится несколько дней). Еще лучше использовать жидкий азот. Значительно худший результат дает смесь, состоящая из одной части (весового) льда или снега и трех частей поваренной соли. В послед-



нем случае удастся получить температуру только минус 15–20 °С, но легко разбить колбу термоса. Оттаивание и повторное замораживание губительны для вирусов.

Вместо замораживания можно использовать для консервации химические консерванты (менее эффективно). Лучшим из последних считают смесь равных объемов стерильных глицерина и 0,85 %-го раствора поваренной соли (изотонический раствор), в которую и помещают биологический материал.

Д. Взятый биологический материал должен быть надежно и четко этикетирован (недопустимо делать надписи карандашом по стеклу). На пробирках или флакончиках достаточно надежной этикеткой является кусочек лейкопластыря, на котором написано простым (графитным) карандашом, какой материал и от какого животного в них помещен. На термос с пробями биологического материала навешивают бирку (из картона или фанеры), на которой указывают название хозяйства, вид животного, вид материала, предположительный диагноз и дату. Термос должен быть опечатан.

## **1.2. Получение биоматериала от больных животных**

От таких животных берут тот материал, в котором можно предполагать наибольшую концентрацию вируса.

Кровь обычно берут из яремной вены в сухую стерильную пробирку без антикоагулянтов. Пробирка должна быть теплой (30–38 °С). Не рекомендуется брать кровь по каплям. Оптимальное количество крови – 10 мл. Обнаружить в ней вирус удастся редко (за исключением пантропных вирусов). Но в сыворотке крови удастся обнаружить антитела к вирусам. Поэтому имеет смысл в лабораторию направлять не кровь, а ее сыворотку. Для получения сыворотки взятую кровь надо поместить на 30 мин в водяную баню с температурой 30–35 °С, а затем на 18–20 ч (на ночь) в холодильник (для ретракции сгустка). Выступившую над сгустком сыворотку отсасывают, переносят (стерильно!) в другую пробирку и хранят в холодильнике 2–3 недели под стерильной пробкой (резиновой или ватной).

Если нет уверенности в стерильности сыворотки, ее лучше заморозить. Это предотвращает бактериальный прирост и сохраняет ранние макроглобулиновые антитела, которые при плюсовой температуре быстро разрушаются. Повторное замораживание после оттаивания недопустимо.

Так как в серологической диагностике решающее значение имеет динамика титров антител к вирусам, кровь берут от одного и того же животного дважды (или даже трижды): в начале заболевания и в конце (обычно через 2–3 недели). Из взятой крови получают две сыворотки (парные), которые и направляют в лабораторию.

Носовые и носоглоточные выделения. Нос животного (крылья носа и начало носовых ходов) обмывают водой, а затем стерильный ватный тампон (на палочке) погружают в глубину носа и пропитывают носовыми секретами. Так же поступают и при получении выделений из глотки, гортани, рта. Пропитанный выделениями тампон помещают во флакончик со стабилизирующей средой.

Конъюнктивальные выделения собирают также на тампоны, которые затем помещают в стабилизирующую среду. Можно смывать конъюнктиву стабилизирующей средой.

Трахеальную слизь берут через трахеотубус или специальный носотрахеальный зонд – резиновую трубку диаметром 0,5–0,6 см, внутрь которой вставлен металлический стержень с кисточкой на конце, а в отверстие одного из концов трубки — наконечник от иглы Сайковича. Зонд через носовое отверстие вводят в трахею, а затем выдвигают из трубки стержень; имеющаяся на нем кисточка вызывает раздражение слизистой оболочки трахеи, в результате чего у животного появляется кашель. Слизь, выделяющаяся во время кашля, попадает на кисточку. После собирания слизи кисточку втягивают в трубку и зонд извлекают. Кисточку с собранной на ней слизью погружают в стабилизирующую среду.

Слюну берут при наличии признаков поражения ротовой полости или слюнных желез. Вытекающую изо рта слюну можно собрать прямо в пробирку. Если слюны выделяется мало и она не вытекает, необходимо ею пропитать стерильный тампон из ваты (на палочке), а затем его поместить в пробирку с небольшим количеством стабилизирующей среды и закрыть резиновой пробкой. Для усиления слюновыделения можно ввести животному пилокарпин (0,02–0,05 г/кг).

Фекалии берут (около 10 г) при подозрении на поражение кишечника при помощи шпателя или палочки из прямой кишки.

Везикулярную жидкость можно забрать с помощью шприца или пастеровской пипетки. Для этого прокалывают стенку везикулы и насаживают жидкость. Так как жидкости обычно бывает мало, удобнее пользоваться пастеровской пипеткой, сохраняя жидкость в отломанном капилляре, который можно запаять с обоих концов.

Корочки с поверхности кожи снимают пинцетом и собирают в пробирку.

### **1.3. Получение биоматериала от павших или вынужденно убитых животных**

Необходимо брать не позже 1–2 ч после клинической смерти (позже начинается бактериальное обсеменение и взять материал стерильно невозможно). В качестве биологического материала чаще всего берут кусочки (размером в несколько кубических сантиметров) тех органов, которые:

а) имеют видимые отклонения от нормы (по форме, размеру, цвету, консистенции, наличию необычных образований);

б) по данным клинической картины перед смертью поражены и могут содержать вирус.

Наиболее часто местом накопления вирусов служат печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические узлы, почки.

Поверхность органа, от которого берут кусочек, вначале прижигают, а затем с помощью стерильных пинцета и ножниц берут пробу, помещая каждую отдельно во флакончик или пробирку, и консервируют. Кроме кусочков органов от трупа могут быть взяты содержимое кишечника, кровь (из сердца, если она не успела свернуться), спинномозговая жидкость и другие материалы при подозрении на содержание в них вирусов.

### **1.4. Правила отбора биологического материала от животных для исследования на вирусно-бактериальные инфекции молодняка крупного рогатого скота**

Желательно провести диагностический убой 1–2 телят, больных респираторными или желудочно-кишечными заболеваниями, не подвергавшихся лечению антибиотиками и гипериммунными сыворотками (гипериммунной кровью).

При невозможности выполнения этого пункта:

– с диагностической целью пометить 1–2 контактных телят в группу животных, у которых регистрируются клинические признаки инфекционных заболеваний. Контактных животных *не подвергать* лечению антибиотиками и гипериммунными сыворотками (гипериммунной кровью), а также другими препаратами;

– в течение 1–2 недель у них разовьются признаки заболевания (угнетение, повышение температуры тела, кашель и т. д.), аналогичные признаки больных животных в основной группе. В этот момент необходимо произвести диагностический убой контактных животных и в кратчайшие сроки отобрать пробы биоматериала (не позднее двух часов после убоя).

Пробы органов и тканей, необходимые для лабораторных исследований, отобранные посмертно:

- 1) слизистая оболочка носа;
- 2) слизистая оболочка трахеи;
- 3) миндалины;
- 4) легочные, бронхиальные лимфоузлы;
- 5) легкие, бронхи;
- 6) печень;
- 7) селезенка;
- 8) брызжеечные лимфоузлы;
- 9) тимус;
- 10) проба тонкого отдела кишечника – до 10 см длиной (разные участки, особенно пораженные), перевязанные с двух сторон шелковой нитью;
- 11) содержимое сустава;
- 12) Пейеровы фолликулы;
- 13) от абортплодов: кусочки мозга, легких, печени, селезенки, почек, кровь, можно свернувшуюся;
- 14) абортплоды до 3–4 месяцев, целиком.

Для лабораторных исследований необходимо отбирать кусочки внутренних органов и тканей размером не более 2 см кубических. Сразу после отбора их необходимо помещать в стерильный пенициллиновый флакон (пробирку) с резиновой пробкой на месте вскрытия животного.

Пробы биоматериала, необходимые для лабораторных исследований, отобранные при жизни животного:

- 1) телята: тампонные пробы носовых, глазных выделений;
- 2) коровы: тампонные пробы вагинальных, маточных, носовых, глазных выделений при гинекологической патологии;
- 3) быки: тампонные пробы выделений из препуция; пробы спермы.

Правила отбора: пробы выделений отбирают при помощи сте-

рильных ватных тампонов 2 на 2 см, к которым привязывают шелковую нитку длиной около 40 см. Тампоны вместе с ниткой помещают в чистый пенициллиновый флакон, закрывают резиновой пробкой так, чтобы свободный конец нити выдавался из-под пробки на 1–2 см и автоклавируют 30 мин при 1 атм.

В хозяйстве для получения выделений тампон извлекают из флакона, помещают при помощи корнцанга или пинцета в носовую полость, влагалище, препуционный мешок и оставляют там на 5–10 минут. Свободный конец нити при этом привязывают к рогу или хвосту животного. По истечении времени тампон извлекают за свободный конец и помещают обратно во флакон, закрыв его пробкой. Нитка отрезается у места соединения с тампоном.

Флаконы с пробами органов и тканей, а также выделений от животного необходимо *немедленно* поместить в заморозку до транспортировки. Транспортировку в лабораторию производить в термосе со льдом.

Следует помнить, что пробы биоматериала, отобранные от убитых животных позднее, чем через 4 часа после гибели или вынужденного убоя, *непригодны* для вирусологических исследований.

Правила отбора проб сыворотки крови для установления ретроспективного диагноза на вирусные инфекции (установление роли вирусов в этиологии респираторных, желудочно-кишечных и гинекологических болезней).

Для этого отбирают парные пробы сыворотки крови от животных. Первая проба – от 1–15 животных в начале развития клинических признаков болезни (не позднее 3–5 дней), а вторая – от этих же животных через 21–30 дней. Пробы сыворотки получают обычным способом (гемолиз не допускается), консерванты не используют. Обе пробы сыворотки немедленно замораживаются (не допускать контаминации бактериями) и транспортируются в лабораторию в замороженном виде. В лаборатории они используются одновременно. Необходимый объем – не менее 3–5 мл сыворотки крови. Сыворотки, подвергшиеся бактериальному, грибковому загрязнению, гемолизированные, к использованию не принимаются.

Следует отметить, что латентную форму ИРТ-ИПВ КРС обычными вирусологическими методами выявить не возможно, поэтому для ее диагностики применяют метод молекулярной гибри-

зации или ПЦР в сочетании с исследованием однократной пробы сыворотки крови от клинически здоровых животных, подозреваемых в вирусоносительстве.

Основанием для постановки диагноза в данном случае будет служить обнаружение антител в сыворотке крови невакцинированного животного и выявление ДНК вируса в исследуемой пробе биоматериала (сперма и т. д.).

### **1.5. Направление в лабораторию**

Взятый стерильно (законсервированный и этикетированный) биологический материал сразу же направляют для исследования в лабораторию с нарочным. С ним же направляют и сопроводительное письмо, в котором должны быть указаны название хозяйства; вид и количество материала, способ его консервации; вид, пол и возраст животных, от которых взят материал; краткие данные об эпизоотологических особенностях болезни, клинических симптомах, патолого-анатомических изменениях и основанный на них предварительный диагноз. В конце должна быть сформулирована просьба, на что исследовать материал, указаны дата и фамилия врача.

В лаборатории полученный биологический материал освобождают от консерванта, взвешивают или измеряют и делят не менее чем на три порции. Затем, приняв во внимание содержание сопроводительного письма, количество материала, его состояние и качество, составляют план исследований. План должен предусматривать исследование материала не менее чем двумя методами с таким расчетом, чтобы получить по возможности быстрый ответ и затем подтвердить его более надежными методами, что даст высокую степень уверенности в правильности результата. Для этого и необходимо деление материала на порции (одну порцию оставляют в резерв).

В зависимости от предполагаемых методов исследования из биологического материала готовят срезы, отпечатки, мазки или суспензию. Срезы делают на замораживающем микротоме, а отпечатки сразу же после расконсервации. Для получения мазков на предметных стеклах из материала готовят гомогенную массу путем растирания в ступке.

## 2. ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Наиболее быстро удастся обнаружить в биологическом материале вирусные антигены (белки вирусов), вирусные тельца-включения, вирионы и вирусные гемагглютинины. Методы их обнаружения объединяют в группу экспресс-методов, а постановка диагноза с их помощью может быть названа экспресс-диагностикой.

Названные методы отличаются двумя особенностями:

– они не нуждаются в дополнительной идентификации, так как основаны на поисках присутствия не вообще вирусов, а определенного вида;

– их выполняют в короткие сроки (от нескольких часов до нескольких дней), поэтому образуется группа быстрых методов, весьма ценных при постановке диагноза.

### 2.1. Обнаружение вирусных антигенов

Вирусные белки, как в составе целых вирионов, так и в виде обломков вирионов, указывают на присутствие определенного вируса в патматериале (каждый вирус имеет специфические для него белки). Как и всякие белки, вирусные белки обладают антигенными свойствами. Более того, они обуславливают антигенные свойства вирусов. Поэтому, располагая сыворотками, содержащими антитела к определенным вирусам, можно обнаружить в биоматериале антигены к этим вирусам с помощью серологических реакций. Лучшие результаты получают при использовании методов флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментного анализа (ИФА), радиоиммунного анализа (РИА), в меньшей степени – реакций связывания комплемента (РСК) и диффузионной преципитации (РДП).

#### *А. Метод иммунофлуоресценции*

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) известна также под названиями метод флуоресцирующих антител, метод иммунофлуоресценции, метод меченых антител. Она может быть поставлена прямым методом и непрямой.

Принцип РИФ основан на использовании явления флуоресценции, которое состоит в испускании света атомами вещества, поглотившими избыточную внешнюю энергию (обычно в виде кван-

тов света) и пришедшими в состояние возбуждения. Атомы одних веществ обладают высокой способностью флуоресцировать (таких веществ немного), а других – низкой и даже нулевой (таких веществ большинство). Если высокофлуоресцирующее вещество обладает способностью вступать в химическую связь с нефлуоресцирующим, то его можно использовать для обнаружения этого нефлуоресцирующего вещества, которое называют флуорохромом.

Так, например, ФИТЦ сильно флуоресцирует желто-зеленым светом при облучении его сине-фиолетовыми лучами и одновременно способен вступать в химическую связь с белками, не изменяя их антигенных свойств (белки сами не обладают способностью к флуоресценции). Это позволяет, обрабатывая белоксодержащие материалы (например, сыворотку крови) раствором ФИТЦ, придавать им способность флуоресцировать, иначе говоря, метить белки флуорохромом ФИТЦ.

Так как антитела к любым антигенам (в том числе и вирусным) представляют собою разновидность белков и содержатся в сыворотке крови, то, обрабатывая такую сыворотку флуорохромом, можно получить флуоресцирующие («меченные» флуорохромом) антитела, которые сохраняют способность к флуоресценции и после того, как войдут в состав комплекса антиген + антитело. При этом немаловажно то, что сыворотки крови (а значит, и все их белки) легко вымываются из препаратов физиологическим раствором, а комплекс антиген + антитело не вымывается.

Чтобы с помощью метода флуоресцирующих антител обнаружить в каком-либо биологическом материале антигены определенного вируса, из этого материала готовят мазки или отпечатки на предметных стеклах, которые после фиксации обрабатывают сывороткой, содержащей меченые антитела, гомологичные тому вирусу, наличие которого предполагается. Если в мазке или отпечатке содержатся антигены, гомологичные антителам сыворотки, то образуются комплексы антиген + антитело. Затем препараты тщательно отмывают буферным физраствором. Все сывороточные белки (а они оказываются мечеными флуорохромом) вымываются, а комплексы антиген + антитело остаются. Препараты сушат и исследуют под люминесцентным микроскопом, который устроен так, что на исследуемый препарат падает пучок сине-фиолетовых лучей, а в глаз наблюдателя попадают только желто-зеленые лучи, которые испускают комплексы



антиген + антитело. По этому свечению и судят о наличии в материале антигенов, гомологичных антителам меченой сыворотки. Это так называемый *прямой метод иммунофлуоресценции*.

*Непрямой метод* состоит в том, что животных одного вида иммунизируют определенным вирусом и получают от них антивирусные сыворотки. Сывороткой крови этого же вида животных иммунизируют животное другого вида и получают от него антивидовую сыворотку, которую и метят флуорохромом (например, ФИТЦ). Исследуемый препарат обрабатывают дважды: вначале немеченой антивирусной сывороткой, а затем после отмывания – меченой антивидовой. После второго отмывания препарат высушивают и исследуют под люминесцентным микроскопом. Если в препарате были антигены, гомологичные антителам антивирусной сыворотки, то они образуют комплексы антиген + антитело, которые не вымываются из препарата. При его обработке второй (меченой) сывороткой содержащиеся в ней антитела вступают в связь с противовирусными антителами (как антигенами по отношению к антителам антивидовой меченой сыворотки) и образуются сложные комплексы, состоящие из вирусных антигенов, гомологичных им противовирусных и антивидовых антител. Эти сложные комплексы после второго отмывания сохраняются в препарате. Они обладают способностью флуоресцировать, так как в их состав входят флуоресцирующие антивидовые антитела. Обнаружение в препаратах специфической флуоресценции указывает на наличие в материале препарата антигенов, гомологичных использованной противовирусной сыворотке.

По эффективности непрямой метод РИФ не уступает прямому, но имеет следующие преимущества:

1) вместо метки флуорохромом каждой антивирусной сыворотки (что довольно сложно и трудоемко) достаточно иметь меченую только одну антивидовую сыворотку;

2) позволяет обнаруживать не только гомологичные данной сыворотке антигены, но и антитела, гомологичные взятому (в препарат) антигену.

В целом метод флуоресцирующих антител обладает следующими достоинствами:

✓ сочетает точность микроскопии со специфичностью серологических реакций;

✓ позволяет обнаруживать самые минимальные (микроскопические) количества антигенов или антител;

- ✓ отличается простотой техники и быстротой получения результата;
- ✓ пригоден для исследования прозрачных и непрозрачных препаратов;
- ✓ возможно фотографирование результата.

#### **Б. Метод иммуноферментного анализа (ИФА)**

Он отличается от РИФ тем, что сыворотку конъюгируют (метят) не флуорохромом, а ферментом (пероксидазой или щелочной фосфатазой) и этим конъюгатом обрабатывают культуру клеток, мазки, отпечатки или срезы исследуемого материала. Затем избыток конъюгата отмывают, а на препарат наносят раствор так называемого субстрата (диаминобензидинтетрахлорида), который под действием фермента изменяет окраску. Учитывают результат под световым микроскопом. Метод ИФА отличается универсальностью, очень высокой чувствительностью и может быть поставлен в прямом и непрямом вариантах.

Сейчас чаще стали применять разновидность этого метода – твердофазный ИФА. Его особенность состоит в том, что исследуемый материал в виде суспензии вносят в лунки полистироловых микропанелей, которые предварительно сами сенсibilизированы гамма-глобулином, содержащим антитела к исследуемому антигену. После отмывания несвязавшихся антител на эти комплексы наносят иммуноферментный конъюгат (антитела, меченные пероксидазой или щелочной фосфатазой), который присоединяется к уже образовавшимся комплексам (непрореагировавший конъюгат отмывают). Затем необходимо обнаружить эти тройные комплексы по содержащемуся в них ферменту. Для этого во все лунки добавляют индикатор, который под действием фермента приобретает цветную окраску. В контрольных лунках такая окраска отсутствует. Метод позволяет автоматизировать процесс и довести производительность исследований до 2000 образцов в час.

#### **В. Метод радиоиммунного анализа (РИА)**

Сыворотку, содержащую антитела к определенному антигену, обрабатывают радиоактивным йодом (J). Такую сыворотку, меченную йодом, наносят на препарат из исследуемого материала. После отмывания непрореагировавшей сыворотки препарат исследуют с помощью счетчика радиоимпульсов или авторадиографа на рентге-

новской пленке, что позволяет обнаруживать образовавшиеся комплексы антиген + антитело.

### *Г. Реакция связывания комплемента (РСК)*

Реакция связывания комплемента более сложная, более громоздкая и менее чувствительная.

Комплемент – это сложный комплекс, входящий в состав сыворотки крови всех млекопитающих. Но больше всего комплемента в сыворотках крови морской свинки и человека (0-группа). Комплемент обладает следующими свойствами:

- ✓ легко разрушается под действием тепла и света ( $t\ 56\ ^\circ\text{C}$  полностью разрушает комплемент за 30 мин);
- ✓ адсорбируется на любом комплексе антиген – антитело независимо от его природы;
- ✓ его присутствие необходимо для протекания некоторых серологических реакций (в частности для лизиса эритроцитов барана сывороткой кролика, иммунизированного эритроцитами барана).

Реакцию ставят в два этапа. Сначала в пробирки наливают равные объемы антигена, сыворотки и комплемента. Полученные смеси выдерживают либо 30 мин при  $37\ ^\circ\text{C}$ , либо 18–20 ч при  $4\ ^\circ\text{C}$ . Если в сыворотке имеются антитела, гомологичные взятому антигену, образуется комплекс антиген + антитело и на нем адсорбируется присутствующий в смеси комплемент, а свободный в этом случае исчезает из смеси. Если же в сыворотке нет антител, гомологичных взятому антигену, комплекс антиген + антитело не образуется и в смеси остается свободный комплемент.

На втором этапе РСК устанавливают, остается ли свободный комплемент или он исчез. К 3-компонентным смесям дополнительно добавляют равные объемы гемолизина кроликов, 3 %-й суспензии эритроцитов барана и вторично выдерживают при  $37\ ^\circ\text{C}$  15–20 мин. Результаты РСК оценивают в процентах гемолиза или в крестах.

Для обнаружения в биоматериале антигенов определенного вируса с помощью РСК готовят суспензию этого материала, разливают ее по пробиркам и добавляют равные объемы сыворотки крови, содержащей антитела к предполагаемому вирусу. Затем в каждую пробирку доливают такие же объемы комплемента в разведениях (обычно с коэффициентом разведения 1, 2). Смеси выдерживают 18–20 ч при  $4\ ^\circ\text{C}$ , добавляют гемолитическую систему и после 20 мин нагревания при  $37\ ^\circ\text{C}$  учитывают результат. Параллельно ставят со всеми дозами

комплемента контроля с нормальными сывороткой, антигеном и контроли всех антигенов. Если окажется, что хотя бы с одной дозой комплемента РСК в опыте будет положительной, а во всех контролях отрицательной, то это указывает на наличие в биоматериале антигена, гомологичного антителам сыворотки. В такой модификации РСК достаточно чувствительна, но выявляет антигены не только истинно специфические для данной сыворотки, но и родственные им, то есть чувствительность РСК здесь групповая.

#### *Д. Реакция диффузной преципитации (РДП)*

Реакцию диффузной преципитации в агаровом геле для обнаружения в биоматериале вирусных антигенов используют редко. Это связано с тем, что РДП обладает низкой чувствительностью. Для обнаружения антигенов в слое 1,2 %-го агара на физрастворе делают лунки, располагая их так, чтобы сыворотка могла взаимодействовать не только с исследуемым антигеном, но и с нормальным (отрицательным) и с антигеном заведомо положительным, которые служат в качестве контролей. Для максимального повышения содержания специфического антигена в испытуемом материале из последнего готовят не суспензию (как обычно), а почти кашицеобразную массу, содержащую минимум растворителя.

Индикация вирусов в патматериале методом обнаружения вирусных антигенов – наиболее часто используемый прием при экспресс-диагностике. Метод флуоресцирующих антител является всегда более предпочтительным, чем РСК и РДП.

## **2.2. Обнаружение вирионов**

### *А. Метод электронной микроскопии*

Вирионы большинства вирусов имеют линейные размеры (меньше половины длины волны видимого света) и недоступны для обнаружения в световом микроскопе. Электронный микроскоп, обладающий разрешающей способностью в тысячи раз более высокой, чем световой, позволяет видеть и изучать вирионы всех известных нам вирусов.

Для обнаружения вируса его необходимо из материала выделить физическими методами (центрифугированием и др.), сконцентрировать, нанести на подложку, подвергнуть контрастированию и уже затем микроскопировать. Обнаруженное с помощью люминесцентного

экрана поле фотографируют и изучают затем уже его фотографию. Если на фотографии окажется вирус, то по морфологии вириона точно его идентифицировать затруднительно, в лучшем случае определить только группу, к которой принадлежит обнаруженный вирус. Вот почему электронную микроскопию редко используют для оперативного обнаружения вирусов в биоматериале. Это скорее инструмент для изучения тонкой морфологии уже известных вирусов.

### **Б. Метод световой микроскопии (вирусоскопия)**

Однако среди вирусов есть гиганты, которые можно обнаружить и в обычный световой микроскоп. Это в основном группа оспенных вирусов. Их обнаружение с помощью светового микроскопа называют вирусоскопией. У животного срезают оспенное поражение на коже (предпочтительно на стадии папулы или везикулы) и делают мазки на обезжиренном предметном стекле. В мазке оказываются вирионы оспы. Чтобы их увидеть, необходимо покрасить методом серебрения по Морозову. Препарат вначале обрабатывают жидкостью Руге (фиксатор), затем раствором танина (протрава), после чего раствором аммиачного серебра (с подогревом). Препарат микроскопируют под масляной иммерсией. Микроскопическая картина в положительном случае: на желтом фоне – очень мелкие, округло-овальной формы темно-коричневые тельца, лежащие группами, рядами или скоплениями, но не одиночно. Это и есть элементарные тельца (вирионы) вируса оспы.

Метод вирусоскопии отличается простотой техники и быстротой, но требует значительного опыта в оценке полученных результатов. В диагностике оспы он имеет вспомогательное значение. При других инфекциях его не применяют.

## **2.3. Обнаружение вирусных нуклеиновых кислот**

### **2.3.1. Метод ДНК-зондов**

Метод состоит в том, что готовят так называемый молекулярный зонд, представляющий собой нити ДНК или РНК, комплиментарные нуклеиновой кислоте того вируса, который необходимо обнаружить. Зонд метят биотином или радиоактивным фосфором ( $P^{32}$ ). После денатурации нуклеиновых кислот в исследуемом материале (например, прогреванием), последний осаждают на специальном фильтре. Затем

через него пропускают растворенный зонд, в результате чего на фильтре односпиральные молекулы нуклеиновых кислот материала и односпиральные молекулы зонда соединяются в двухспиральные на участках, где они оказываются комплементарными (молекулярная гибридизация). Не подвергшиеся гибридизации односпиральные нуклеиновые кислоты зонда вымываются из фильтра. Гибридные двухспиральные молекулы нуклеиновых кислот на фильтре обнаруживают в случае метки зонда биотином по изменению окраски после добавления авидина (биотин с авидином дают цветное окрашивание), а в случае метки радиоактивным фосфором – с помощью счетчика радиационных импульсов.

По степени чувствительности этот метод не имеет себе равных среди других диагностических тестов. Кроме того, он позволяет обнаруживать в материале любые формы вирусов, включая и интегрированные в геноме клеток.

### **2.3.2. Метод ПЦР (полимеразной цепной реакции)**

ПЦР в США (1983 г.) использовали в генетике, судебной медицине.

В ПЦР другой подход, в пробирке накапливают нуклеиновые кислоты. В двухспиральной ДНК 3 миллиарда нуклеотидных пар: А-Г, Т-У и т. д. В какой последовательности они расположены? Есть уникальные участки нуклеиновой кислоты, только один у каждого семейства 35–36 тыс. нуклеотидных пар.

1. При нагревании пробирки до 92–95 °С, водородные связи разрываются, происходит денатурация, плавление.

2. При нагревании той же пробирки до 50–65 °С образуется двухцепочная ДНК, связи восстанавливаются.

*Суть метода:* амплификация, то есть увеличение числа копий строго определенных фрагментов ДНК в пробирке (*in vitro*) с помощью фермента ДНК-полимеразы, который осуществляет синтез взаимокompенсаторных цепей ДНК, начиная с двух праймеров (затравки). Этот фрагмент ДНК состоит из 20–30 нуклеотидов (синтезируют искусственно).

ПЦР состоит из 20–40 циклов, каждый включает три этапа:

1. Денатурация, происходит при температуре 92–95 °С 1 минуту (отсоединение цепей).

2. Отжиг (присоединение праймеров) происходит при температуре 50–60 °С 1 минуту.

3. Элонгация, происходит при температуре 68–72 °С (достраивание цепей ДНК).

Все повторить, получится 4 фрагмента двухцепочной  $2^n \cdot 2^{20} \cdot 2^{40}$  ДНК, большое количество которых можно найти определенным методом (первые служат матрицей и т. д.).

*Метод электрофореза в агаровом геле* используют часто:

1. Из биоматериала выделяют нуклеиновые кислоты (фенол, хлороформ, спирт), адсорбируют 100 мкл (0,1 мл) в эпиндорф время 2 часа.

2. В пробирку добавляют нуклеиновую кислоту, амплификационную смесь: буфер, 4 вида нуклеотидов (А, Г, У, Т), ДНК-полимеразу; два вида праймеров. MgCl (для работы фермента) и диоинезированную воду, сверху вносят минеральное масло (для предотвращения испарения смеси).

3. Пробирки вносят в программированный термостат (меняет температуру) на 2–3 часа. Одновременно ставят положительный и отрицательный контроли.

4. Регистрация результатов (детекция амплификантов методом электрофореза в агаровом геле в присутствии бромистого этидия, который соединяется с фрагментами ДНК и выявляется в виде светящейся полосы при ультрафиолетовом облучении на трансиллюминаторе).

## **2.4. Обнаружение вирусных телец-включений**

Присутствие некоторых вирусов в биоматериале удастся установить по наличию вирусных внутриклеточных включений, или телец-включений. Известно значительное количество вирусов, которые при репродукции в определенном типе клеток дают образование в этих клетках телец-включений. В большинстве случаев ДНК-содержащие вирусы дают внутриядерные включения, а РНК-содержащие – цитоплазматические. Небольшая группа вирусов способна давать как цитоплазматические, так и внутриядерные включения. По своей природе телец-включения могут представлять скопления (колонии) зре-

лых вирионов в местах их сборки или материал, возникший в процессе репродукции вируса и не вошедший в состав вирионов, или то и другое вместе.

Тельца-включения, образуемые каждым вирусом, отличаются определенной способностью к окрашиванию, формой, размером, местоположением в клетке. Эти признаки позволяют по обнаружению в клетках животного специфических телец-включений судить о пребывании в этих клетках того или иного вируса, что используют в диагностике некоторых вирусных инфекций.

Тельца-включения, образуемые рядом вирусов, получили специальные названия. Так, цитоплазматические тельца-включения, образуемые в нервных клетках (нейронах) млекопитающих вирусом бешенства, называют тельца Бабеша-Негри; в эпителиальных клетках овец – вирусом оспы овец – тельца Борреля; вирусом оспы кур – тельца Боллингера; вирусом чумы собак – тельца Зейфреда.

Но наибольшее практическое значение приобрели тельца Бабеша-Негри в диагностике бешенства. Если возникло подозрение на заболевание животного бешенством, у него надо взять головной мозг. Из кусочков определенных отделов головного мозга (аммоновых рогов мозжечка, продолговатого мозга) готовят гистологические срезы или делают мазки на предметных стеклах (реже). Полученные препараты окрашивают специально на тельца Бабеша-Негри одним из предложенных для этой цели методов (по Муровцеву, по Туревичу и др.). Окрашенные препараты исследуют под световым микроскопом (масляная иммерсия) в целях поиска телец Бабеша-Негри. Каждый метод окраски дает свою характерную картину. Приходится просматривать очень много полей, но если характерные тельца Бабеша-Негри (а их надо уметь узнавать) будут обнаружены, то наличие вируса бешенства считают доказанным.

К сожалению, тельца Бабеша-Негри удается установить не в 100 % случаев бешенства, так как не все штаммы вируса их дают, а для их образования требуется определенный минимальный срок. Поэтому отсутствие (или необнаружение) телец Бабеша-Негри еще не говорит об отсутствии в материале вируса бешенства. Для его обнаружения суспензией мозга животного заражают 10-граммовых мышей (биопроба).



## 2.5. Обнаружение вирусных гемагглютининов

В составе вирионов некоторых вирусов содержится особое вещество белковой природы (гликопротеид), способное адсорбироваться на оболочках эритроцитов крови. Вирусные частицы, содержащие в своем составе гемагглютинин, также адсорбируются на эритроцитах. Одна вирусная частица способна адсорбироваться одновременно на двух эритроцитах, образуя мостик между ними и удерживая их один около другого. Если в суспензию эритроцитов добавить суспензию вирионов, содержащих гемагглютинин, то вследствие адсорбции вирионов на эритроцитах происходит склеивание (агглютинация) эритроцитов в хлопья или комочки, видимые невооруженным глазом. Такое явление получило название реакции гемагглютинации (РГА). С помощью РГА легко и просто можно обнаружить наличие гемагглютинирующих вирусов в определенных средах. Однако обнаружение вирусов с помощью РГА в диагностике вирусных инфекций имеет довольно ограниченное применение, так как:

а) вирусов, содержащих в вирионах гемагглютинин, известно сравнительно мало;

б) у некоторых вирусов гемагглютинин находится не на поверхности, а в глубине вирионов, чтобы такой вирус дал РГА, приходится предварительно проводить частичную дезинтеграцию вирионов;

в) каждый гемагглютинирующий вирус способен давать РГА только с эритроцитами определенных видов животных, при определенных температуре и значениях рН; поэтому для каждого вируса необходимо знать и воспроизводить весь комплекс условий получения РГА, что затрудняет ее использование;

г) для появления отчетливо наблюдаемой РГА необходима определенная минимальная концентрация вирионов в смеси вируса с эритроцитами, а в большинстве случаев в суспензии из биоматериала такой концентрации не достигают.

Вследствие вышеназванных причин РГА чаще используют для индикации гемагглютинирующих вирусов в суспензиях лабораторного происхождения (где и вирус известен, и его титр повыше), чем в полевых материалах.

Простейшей модификацией является капельная РГА. Для ее постановки на какую-либо чистую поверхность (стекло, керамика, пластмассы) наносят каплю жидкости, в которой требуется установить

наличие гемагглютинирующего вируса, и добавляют к ней каплю 5%-й суспензии отмытых эритроцитов. Через 5–10 мин после смешивания каплю смотрят, появились хлопья эритроцитов или нет. Если видны хотя бы совсем мелкие хлопья в виде крупинок, то можно считать РГА положительной, так как одиночные эритроциты (5–7 мкм в диаметре) невооруженным глазом не различают. В случае положительной РГА наличие вируса в исследуемой жидкости можно считать доказанным.

## 2.6. Диагностическое значение экспресс-методов

Основная ценность экспресс-методов:

а) возможность быстрого обнаружения присутствия определенных вирусов в биологическом материале, поскольку сроки исследования колеблются от 2–3 ч до 2–3 дней (в зависимости от используемого метода);

б) методы направлены на поиск в биологическом материале определенного вируса, чем снимается необходимость последующей идентификации обнаруженного вируса.

Основные недостатки экспресс-методов:

а) позволяют обнаруживать в исследуемом материале не активные формы вирусов, а только отдельные их элементы (антигены, нуклеиновые кислоты, гемагглютинины и др.) и считать, что они свидетельствуют о репродукции в клетках исследуемого материала того вируса, элементы которого обнаружены;

б) относительно невысокая степень достоверности результатов, заложенная в самой технике обнаружения определенных элементов вирусов. Так, МФА страдает субъективностью оценки результатов, может давать перекрестное и неспецифическое свечение. Сходные недостатки свойственны также ИФА и РДП. Методы молекулярных зондов и электронной микроскопии технически сложны и допускают неоднозначность интерпретации результатов. Что же касается телец-включений и гемагглютининов, то их обнаруживают только в небольшом проценте случаев и при инфекциях, вызываемых только некоторыми вирусами.

Несмотря на отмеченные недостатки, использование для диагностики вирусных инфекций лабораторных экспресс-методов является обязательным, так как они позволяют быстро установить, какой именно патогенный вирус содержится в биологическом материале, а

значит и в организме больного животного. В совокупности с данными клиники, патанатомии и эпизоотологии эти сведения дают возможность поставить относительно уверенный диагноз уже в первые дни болезни.

### **3. ДЛИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

#### **3.1. Индикация вирусов в биологическом материале методом биологической пробы**

Биологической пробой называют экспериментальное заражение вирусосодержащим материалом (суспензией вируса, полученной из патматериала) чувствительных к предполагаемому вирусу живых систем. Это наиболее старый и наиболее чувствительный метод индикации вирусов. Можно уверенно утверждать, что о существовании всех известных нам вирусов мы знаем по их действию на определенные живые системы.

Выбор подходящей живой системы – важнейший элемент постановки биопробы. В качестве живых систем в лабораториях используют культуры клеток, куриные эмбрионы, лабораторных и естественно восприимчивых животных. При выборе объекта для биопробы учитывают предварительный (клинико-эпизоотологический) диагноз, который позволяет сузить поиск до минимального количества вирусов, что, в свою очередь, дает возможность взять те живые объекты, которые заведомо чувствительны к предполагаемым в материале вирусам. Учитывают также вид больных животных, от которых получен материал на исследование.

Если биоматериал получен от млекопитающих животных, наиболее подходящей живой системой для индикации в нем вирусов чаще всего оказывается культура клеток, полученная из тканей того же вида животного, от которого получен биоматериал, поскольку вирусы, содержащиеся в биоматериале, уже адаптированы к клеткам этого вида. Из этого общего правила бывают исключения. Так, вирус бешенства не вызывает ЦПД (цитопатического действия) ни в какой культуре клеток и для его индикации более подходит биопроба на лабораторных животных. Вирус классической чумы свиней также не проявляет своего действия ни на культуры клеток, ни на лаборатор-

ных животных, и для его индикации приходится использовать естественно восприимчивое животное (поросенка). Иногда вирус способен репродуцироваться в гетерологичной культуре клеток (так, вирус гриппа свиней дает ЦПД в культуре фибробластов крупного эмбриона).

Если биоматериал получен от кур, целесообразно биопробу ставить на куриных эмбрионах, которые проще получить и они дешевле, чем культуры клеток. При получении биоматериала от других видов птиц для индикации в нем вирусов используют эмбрионы этих же видов птиц, хотя нередко удается индикация вирусов и на куриных эмбрионах.

Следует отметить, что в I пассаже вирус редко проявляет свое действие на культуру клеток или куриный эмбрион, так как для этого необходимо достижение вирусом минимальной инфекционной дозы и адаптации к лабораторной системе. Поэтому при отсутствии показателей действия вируса из биоматериала на лабораторные объекты этот I пассаж считают «слепым», собирают из зараженного объекта вирусосодержащий материал и приводят II, а иногда III и даже IV пассажи (пока не обнаружат вирус).

#### Живые биологические системы для культивирования вируса

Объект биопробы	Обнаруживаемый вирус	Показатель наличия вируса в патматериале
Культуры клеток	Подавляющее большинство вирусов млекопитающих и птиц	ЦПД, гемадсорбция, бляшкообразование
Куриные эмбрионы	Большинство вирусов птиц и некоторые вирусы млекопитающих	Смерть, патолого-анатомические изменения
Лабораторные животные	Болезнь Ауески, бешенства, ящура	Клинические симптомы, смерть, патолого-анатомические изменения

#### *А. Получение суспензии вируса из биологического материала*

Наиболее сложная процедура приготовления суспензии для биопроб. Материал тщательно растирают в фарфоровой ступке, чтобы разрушить все клетки и неклеточные образования и дать возможность вирусным частицам свободно переходить во взвешенное состояние.

Растирать в ступке лучше без всяких добавлений, но если в материале содержатся трудно растираемые образования (сухожилия, кожа, кости), можно добавить стерильный кварцевый песок. Добавлять толченное стекло менее желательно, так как оно обладает щелочными свойствами и может инактивировать часть вирусных частиц. На тонко растертых песчинках или частицах стекла, обладающих большой поверхностью, часть вируса может адсорбироваться и уйти в удаляемый осадок.

Растиертый биологический материал (вместе с песком, если его добавляли) суспендируют в стерильном изотоническом растворе хлористого натрия с рН=7,2–7,4 или в сбалансированном физиологическом растворе, добавляя его в соотношении 1:5–1:10. Полученную суспензию биологического материала освобождают от крупных частиц центрифугированием при малых оборотах (2–3 тыс. об./мин в течение 20–30 мин), при которых вирусные частицы не осаждаются. Надосадочную жидкость отделяют от осадка и условно считают ее суспензией вируса. Затем ее освобождают от микрофлоры, пропуская через бактериальный фильтр (это делают не часто, так как теряется много вирусов) или обрабатывая антибиотиками широкого спектра действия. Чаще всего к суспензии вируса, если биологический материал был заведомо стерильным, добавляют по 100 Ед пенициллина и 100 мг стрептомицина на каждый миллилитр. Если стерильность патологического материала сомнительна, то дозу антибиотиков увеличивают до 1–2 тыс. Ед/мл. Экспозиция с антибиотиками должна быть не менее 30–60 мин при комнатной температуре.

После обработки антибиотиками суспензию вируса подвергают бактериологическому контролю путем посева на твердые и жидкие питательные среды, а также на среды для аэробов и анаэробов. Пока идет бактериологический контроль, суспензию хранят замороженной. Если бакконтроль окажется отрицательным, ее считают свободной от бактерий и грибов и могут использовать для обнаружения в ней вирусов путем биопробы. При положительном бакконтроле суспензию вируса подвергают дополнительной обработке и ставят бакконтроль повторно.

#### **Б. Биопроба на культурах клеток**

Культурами клеток называют клетки многоклеточного организма, живущие и размножающиеся вне организма (*in vitro*).

Применяемые в практике культуры клеток можно разделить на однослойные и суспензионные. Однослойными называют культуры клеток, в которых клетки живут и размножаются, плотно прикрепляясь к твердой поверхности (стенке матраса или пробирки) и располагаясь слоем толщиной в одну клетку. В суспензионных культурах клетки живут и размножаются, будучи взвешенными в жидкой питательной среде.

Однослойные культуры клеток делят на первичные, диплоидные и перевиваемые. Первичными называют культуры клеток, получаемые непосредственно из тканей животных. Культуры обладают диплоидным набором хромосом и не способны к длительным перевивкам (пассажам).

Диплоидными называют культуры клеток, получаемые из первичных, обладающие диплоидным набором хромосом и способные к большому (50–70), но ограниченному количеству перевивок.

После заражения культуры клеток вирусосодержащим материалом матрасы закрывают герметически резиновыми пробками и ставят на инкубацию в термостат (как и при выращивании клеток). Желательно, чтобы поддерживающая среда не содержала неспецифических ингибиторов или неспецифических противовирусных антител, способных нейтрализовать вирусы.

В термостате адсорбировавшиеся на клетках вирусные частицы проникают внутрь клеток, и начинается их репродукция. Новые вирусные частицы покидают (полностью или частично) клетки, в которых они образовались, проникают в непораженные клетки, репродуцируются в них, переходят в новые клетки и поражают их. В результате такого процесса практически все клетки в матрасе или пробирке оказываются пораженными вирусом (хотя абсолютно все клетки почти никогда не поражаются, всегда остается очень небольшая часть не пораженных вирусом клеток).

Вирус накапливается в основном в культуральной жидкости, но часть вирионов может оставаться и внутри не разрушенных вирусом клеток.

О накоплении вируса в зараженной культуре клеток можно судить по цитопатическому действию ЦПД, по положительной гемадсорбции или по образованию бляшек. ЦПД – это любые изменения клеток, отсутствующие в контрольных (незараженных) культурах. Обычно их можно видеть при микроскопировании культур клеток в

виде разрушения или деформации клеток (фрагментация, округление, симпластообразование).

*Гемадсорбция* – это прикрепление эритроцитов крови к поверхности зараженных клеток; наблюдают при добавлении в испытываемую культуру клеток эритроцитов того вида животных, которые агглютинируются вирусом, присутствующим в зараженных клетках.

*Бляшки* – это образовавшиеся в слое живых клеток островки мертвых клеток, погибших вследствие репродукции в них вирионов. Для получения бляшек в матрасах выращивают клеточный монослой и заражают его суспензией вирионов. После адсорбции на клеточный монослой наносят агаровое покрытие, в состав которого входят питательная среда, агар и в качестве индикатора нейтральный красный. В термостате зараженные клетки погибают. Над островками погибших клеток агаровое покрытие остается бесцветным, а над остальным слоем живых клеток оно краснеет под действием кислых продуктов клеточного метаболизма. Островки мертвых клеток, видимые в виде светлых пятен на красно-розовом фоне, называют бляшками.

#### **В. Биопроба на куриных эмбрионах**

Куриные эмбрионы представляют живую систему, которую легко получить и в клетках которой могут репродуцироваться вирионы многих вирусов. Структурами, в которых возможна репродукция вирионов, являются тело зародыша и хорион-аллантаисная оболочка. Накапливаясь вирионы могут кроме этих структур также в экстраэмбриональных жидкостях (аллантаисной и амниотической).

Пути экспериментального заражения куриных эмбрионов:

- 1) в аллантаисную полость;
- 2) на хорион-аллантаисную оболочку;
- 3) в желточный мешок;
- 4) амнион;
- 5) тело зародыша;
- 6) вены ХАО.

Выбор пути заражения зависит от тропизма вируса, которым предполагают провести заражение. Для каждого пути заражения выбирают оптимальный возраст зародыша.

Для заражения в желточный мешок наиболее подходящими являются эмбрионы на 5–7-й день инкубации; в аллантаисную полость – 9–10-й день; в амнион – 6–10-й; на ХАО – 11–13-й день.

В практике наиболее часто используют заражение в аллантаоисную полость и на ХАО, реже – в желточный мешок и амнион, еще реже – в тело зародыша и вены. При любом пути заражения доза заражающего материала равна 0,1–0,2 мл.

Зараженные куриные эмбрионы помещают в термостат для дальнейшей инкубации, в процессе которой происходит репродукция внесенных вирусов и их накопление в соответствующих структурах.

О размножении вируса, а значит и о его присутствии в заражающем материале, судят по гибели зараженных эмбрионов и по патолого-анатомическим изменениям в зародышевых структурах. Гибель зараженных куриных эмбрионов устанавливают путем овоскопирования. Патолого-анатомические изменения устанавливают путем вскрытия зараженных эмбрионов. При вскрытии берут и вирусосодержащий материал (для поддержания штамма, его накопления или использования с другими целями).

*Г. Биопроба на лабораторных и естественно восприимчивых животных*

Обычно используют следующие виды лабораторных животных: белые мыши; белые крысы; золотистые хомячки; морские свинки; кролики.

Иногда в качестве лабораторных используют домашних животных: голубей, цыплят, щенят, котят и другой молодняк.

Пути экспериментального заражения лабораторных животных многочисленны и их выбирают в соответствии с тропизмом предполагаемого в материале вируса. Реакция зараженных животных на вирус в заражающем материале может проявиться в виде клинических симптомов заболевания, смерти или патолого-анатомических изменений, устанавливаемых на вскрытии.

Для индикации вирусов в биоматериале лабораторных животных используют относительно редко, так как вирусов, к которым они чувствительны, немного. При подозрении на болезнь Ауески используют биопробу на кролике (очень специфична), на ящур – на морской свинке, на бешенство – на подсосных мышатах.

Биопробу на естественно восприимчивых животных ставят точно так же, как и на лабораторных животных. Но к ней прибегают только в тех случаях, когда невозможно использовать лабораторные живые системы. Например, вирус классической чумы свиней не удастся обнаружить биопробой ни на культуре клеток, ни на куриных эм-



брионах, ни на лабораторных животных. Поэтому приходится ставить биопробу на поросятах. Однако такие случаи довольно редки.

Данный метод нашел применение при подозрении только на некоторые вирусные инфекции. Но и при подозрении на эти инфекции к нему прибегают только в крайнем случае.

### **3.2. Выделение (изоляция) вирусов, обнаруженных биопробой**

Обнаружение вируса в биологическом материале от больных животных еще недостаточно для суждения о причине заболевания, так как данные биопробы в большинстве случаев еще не указывают, какой именно вирус обнаружен. Его надо еще идентифицировать, то есть установить вид, для чего необходимо предварительно накопить массу обнаруженного вируса. С этой целью от объектов, положительно прореагировавших на экспериментальное заражение, собирают вирусосодержащий материал.

В культурах клеток вирусосодержащим материалом является культуральная жидкость и оставшиеся не разрушенными клетки (их разрушают путем последовательного замораживания и оттаивания). В зараженных куриных эмбрионах вирусосодержащим материалом могут служить эмбриональная жидкость, если установлено накопление в ней вируса, или хорион-аллантоисная оболочка и органы зародыша, если они имеют патолого-анатомические изменения, свидетельствующие о репродукции в них вируса. От экспериментально зараженных лабораторных и естественно восприимчивых животных в качестве вирусосодержащего материала берут органы, имеющие патолого-анатомические изменения, или органы, о поражении которых вирусами можно судить по предсмертной клинической картине.

Если собрать вирусосодержащий материал в количестве, достаточном для дальнейших исследований, с первого раза не удалось, проводят второй пассаж. Для этого снова тем же путем заражают собранным вирусосодержащим материалом те же живые системы, но в большем количестве, чем первоначально, и после проявления действия вируса собирают теперь уже возросшую массу вирусосодержащего материала. Такой сбор и называют выделением, или изоляцией вируса из биоматериала. Собранный вирусосодержащий материал может быть использован с различными целями, в том числе и в качестве антигена для идентификации выделенного вируса в серологических реакциях.

### 3.3. Идентификация выделенных вирусов

Судить о том, какой именно вирус обнаружен в материале, в ряде случаев удастся уже по характеру ответа на биопробу. Так, при подозрении на болезнь Ауески, ставят биопробу на кролике путем внутримышечного введения суспензии патматериала. Развитие у кролика характерной клинической картины (зуд, расчесы и гибель) указывает на наличие в патматериале именно вируса болезни Ауески.

При подозрении на бешенство ставят биопробу на мышатах (заражают интрацеребрально суспензией исследуемого материала). В этом случае на наличие в материале именно вируса бешенства указывает развитие параличей и смерть при обнаружении в мозге телец Бабеша-Негри.

На оспу кур ставят биопробу на молодом петушке, на оспе овец – на ягнятах, на ящур – на морской свинке, на чуму крупного рогатого скота – на теленке.

Но таких случаев, когда можно путем биопробы не только обнаружить вирус в патматериале, но и более или менее уверенно идентифицировать его, немного. В большинстве случаев приходится для идентификации вирусов проводить специальные исследования.

Наиболее уверенную идентификацию вирусов можно провести с помощью серологических реакций, основанных на взаимодействии антигенов с гомологичными им антителами. Вирионы любого вируса содержат специфические (присущие только данному вирусу) белки, которые и являются антигенами. Если в лаборатории имеется набор сывороток, каждая из которых содержит антитела только к одному вирусу, то можно установить, какой вирус выделен. Для этого с выделенным вирусом (как антигеном) надо испытать на взаимодействие имеющиеся сыворотки (как антитела). Та сыворотка, которая даст с выделенным вирусом образование комплекса антиген + антитело, укажет, какой это вирус, так как антитела взаимодействуют только с тем антигеном, на который они образовались в организме животного (гомологичными).

Для идентификации вирусов наиболее подходят следующие серологические реакции:

- ✓ нейтрализации (РН);
- ✓ торможения гемагглютинации (РТГА);
- ✓ торможения гемадсорбции (РТГАд);

- ✓ связывания комплемента (РСК);
- ✓ диффузионной преципитации (РДП).

Методы обнаружения нуклеиновых кислот вирусов:

- ✓ ДНК-зонды;
- ✓ полимеразно-цепная реакция (ПЦР).

Принцип **РН** состоит в том, что в пробирке смешивают антиген (суспензию вируса) и антитела (сыворотку крови). Затем, после определенной экспозиции, смесь испытывают на наличие в ней активного вируса путем биопробы на лабораторных животных, куриных эмбрионах или культурах клеток. Эти объекты, естественно, должны быть чувствительны к данному вирусу. Если во взятой сыворотке сохранились антитела, гомологичные взятому вирусу, то он будет нейтрализован антителами сыворотки, и биопроба окажется отрицательной (то есть не покажет наличия вируса в смеси), что и свидетельствует об образовании комплекса антиген + антитело.

Для идентификации вируса в РН берут ряд пробирок и наливают в них сыворотки, содержащие антитела к известным вирусам. Затем ко всем сывороткам добавляют суспензию исследуемого материала (вируса), количество которого должно быть взято с таким расчетом, чтобы в любой из сывороток было бы заведомо достаточно антител для полной нейтрализации вируса и чтобы он мог четко проявить свое действие при биопробе. После экспозиции каждой смесью заражают несколько чувствительных к данному вирусу живых объектов и учитывают, какая из сывороток защитила живые объекты от действия исследуемого вируса. Так как сыворотки нейтрализуют только гомологичные им вирусы, то, зная к какому вирусу содержатся антитела в каждой сыворотке, легко установить, какой вирус выделен из биоматериала.

Если выделенный вирус обладает способностью вызывать агглютинацию эритроцитов какого-либо вида животных (а это надо установить проверкой), то легче всего идентифицировать такой вирус в **РТГА**. Принцип РТГА такой же, как и РН, но обнаруживают вирус в смеси с сывороткой путем постановки реакции гемагглютинации вместо биопробы (что значительно проще и легче). Так же готовят ряд смесей исследуемого вируса с различными, заведомо известными сыворотками, и после экспозиции к каждой смеси добавляют суспензию отмытых эритроцитов крови. Сыворотка, содержащая антитела к исследуемому вирусу, нейтрализует его гемагглютинины и ге-

магглютинации не будет. Смеси же вируса с сыворотками, не содержащими антител к исследуемому вирусу, после добавления эритроцитов дадут гемагглютинацию. Исследуемый вирус будет относиться к тому виду, антитела к которому содержатся в сыворотке, давшей задержку (торможение) гемагглютинации.

Если выделенный вирус окажется гемагглютинирующим и размножен в культуре клеток, то добавление в такую зараженную культуру суспензии отмытых эритроцитов обычно ведет к появлению гемадсорбции. Если же такую зараженную культуру клеток перед добавлением в нее эритроцитов обработать (сполоснуть) сывороткой, содержащей антитела к этому же вирусу, то гемадсорбция не наступит (произойдет ее торможение). Для идентификации вируса достаточно заразить им ряд культур клеток в пробирках, а затем поставить **РТГАд** с несколькими сыворотками, содержащими антитела к предполагаемому вирусу. Та сыворотка, которая вызовет торможение гемадсорбции (при наличии гемадсорбции в контроле), укажет, каким вирусом заражена культура клеток.

Для идентификации вирусов иногда применяют также **РСК** (например, для определения типа и варианта вируса ящура). Реакцию связывания комплемента ставят с двукратными разведениями стандартных сывороток (содержащих антитела к определенным вирусам) и исследуемым вирусом, используемым в качестве антигена. Сыворотки берут с одинаковыми титрами антител. Гомологичной для исследуемого вируса признают ту сыворотку, которая дает положительную РСК в наиболее высоком разведении. Постановка реакции в значительной степени осложняется необходимостью предварительного титрования практически всех ее компонентов. При необходимости ознакомиться с деталями техники идентификации вирусов в РСК рекомендуется проработать, например, инструкцию по типированию вируса ящура.

**РДП** основана на том, что в геле, образованном 1,0–1,2 %-м агаром на изотоническом растворе хлористого натрия, антитела и растворимые антигены вирусов способны диффундировать, а комплекс антиген + антитело такой способностью не обладает. Для постановки реакции в слое агарового геля на предметном стекле или в чашке Петри делают углубления (лунки), расположенные по определенной схеме в зависимости от поставленной задачи. В лунки наливают антигены и сыворотки, которые начинают диффундировать в гель во все стороны от каждой лунки. Если лунки расположены так, что ан-

тиген и антитело диффундируют навстречу друг другу, то в случае их гомологичности образуется комплекс антиген + антитело, выпадающий в осадок на месте образования в виде беловатой полосы преципитации, видимой невооруженным глазом. Если же антиген и антитело (сыворотка) не гомологичны, полосы преципитации не образуется.

Для идентификации в РДП неизвестного вируса исследуемый вирус помещают в центральную лунку, а в лунки вокруг нее наливают сыворотки, каждая из которых содержит антитела к определенному вирусу. Образование полосы преципитации между исследуемым вирусом и одной из сывороток указывает, какой вирус был выделен. Недостатком РДП является ее низкая чувствительность, так как для образования отчетливо видимой полосы преципитации требуется, чтобы и антиген и антитело были в достаточно высоких титрах.

### **3.4. Доказательство этиологической роли выделенного вируса**

Если серологическая реакция подобрана и обнаруженный вирус идентифицирован, то еще остается доказать его этиологическую роль в заболевании животного (животных). Такую роль можно считать доказанной, если будет установлено нарастание титра антител к выделенному вирусу в парных сыворотках от животных, послуживших источником получения биологического материала. А это требует дополнительных исследований. Иногда для доказательства этиологической роли выделенного вируса в заболевании животных пытаются воспроизвести это заболевание на здоровых животных (обычно молодняке) того же вида путем заражения их выделенным вирусом. Однако этот метод кроме дороговизны имеет и тот недостаток, что далеко не всегда гарантирует возможность воспроизведения болезни. В целом диагноз на основании вирусологических исследований патматериала можно считать достаточно убедительным. Однако он сопряжен с длительными и трудоемкими исследованиями.

Установление в материале от больных животных присутствия определенных вирусов методом биологической пробы и доказательство их этиологической роли дает очень достоверные данные для постановки диагноза на вирусное заболевание. Однако из-за длительности самих исследований эти данные носят ретроспективный характер и для животных, от которых получен биологический материал, они уже не имеют значения, так как к этому времени эти животные уже или выздоровеют, или падут, или будут вынужденно убиты.

#### 4. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Вирусы обладают антигенными свойствами, так как белки, входящие в состав вирионов и неструктурные, являются антигенами, поскольку они содержат чужеродную для организма генетическую информацию. На проникновение вирусов организм высших позвоночных животных реагирует выработкой специфических белков, относящихся к классу гаммаглобулинов, и называемых антителами. Антитела накапливаются в основном в сыворотке крови, меньше в других жидкостях организма. Антитела обладают свойством вступать во взаимодействие только с тем антигеном, на который они образовались (специфичность антител). Такое взаимодействие возможно и в организме, и в пробирке. В результате взаимодействия антител с гомологичным антигеном образуется комплекс антиген + антитело, чем нейтрализуется действие антигена на организм. Поэтому антитела являются фактором защиты организма от различных инфекционных агентов, включая и вирусы.

Антитела в сыворотке крови животных обнаруживают с помощью серологических реакций, используя заведомо известные антигены. В зависимости от используемой реакции различают антитела: вируснейтрализующие, антигемагглютинирующие, комплементсвязывающие, преципитирующие. Концентрацию или титр антител в сыворотке выражают тем наивысшим разведением сыворотки, в котором еще проявляется взаимодействие антител с гомологичным антигеном.

Противовирусные антитела образуются в организме в ответ на проникновение вируса парентеральным путем. Начинается антителообразование не сразу после заражения, а только через несколько дней. Титр антител в сыворотке крови вначале бывает низкий, а затем постепенно возрастает, достигая максимума к периоду реконвалесценции (выздоровления). В дальнейшем их титр чаще всего снижается, но обычно это происходит очень медленно, так что антитела в сыворотке переболевшего животного удается обнаруживать месяцы, а иногда и годы. Бывают и исключения. Так, на заражение свиней вирусом африканской чумы животные не вырабатывают вируснейтрализующих антител.

Обнаружение антител к вирусам в сыворотке крови животного еще не говорит о его болезни, поскольку многие антитела сохраняют-

ся в крови и после выздоровления. Оно лишь свидетельствует о том, что организм животного контактировал с данным вирусом. Обычно в период активной вирусной инфекции в сыворотке крови повышается титр антител к вирусу, вызвавшему болезнь. Поэтому для постановки диагноза методом исследования сыворотки у больного животного кровь берут дважды: в начале болезни и в период выздоровления (чаще всего через 2–3 недели).

В полученных из двух проб крови парных сыворотках определяют титры антител к вирусам, предположительно вызвавшим заболевание. Считается, что повышение титр антител во второй сыворотке по сравнению с первой в четыре и более раз свидетельствует об активной инфекции в период взятия крови, вызванной тем вирусом, титр антител к которому возрос. Этот диагноз, поставленный на основании серологических исследований, является высоко достоверным, но имеет ретроспективное значение.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Мы рассмотрели общие принципы обнаружения и идентификации вирусов в материале от больных животных. Однако каждый вирус имеет свои индивидуальные особенности, которые необходимо учитывать, чтобы выбрать кратчайший путь исследования материала. Обычно исследуют биоматериал от одного и того же животного одновременно двумя-тремя путями, чаще всего сочетая культивирование вирусов на живых объектах с экспресс-исследованиями. Этим достигается быстрота получения результата (экспресс-методы) и его высокая достоверность вследствие подтверждения результата экспресс-исследования выделением и идентификацией вируса с помощью живых объектов. Высокодостоверный результат исследования биоматериала на вирусы служит надежной основой для постановки уверенного диагноза.

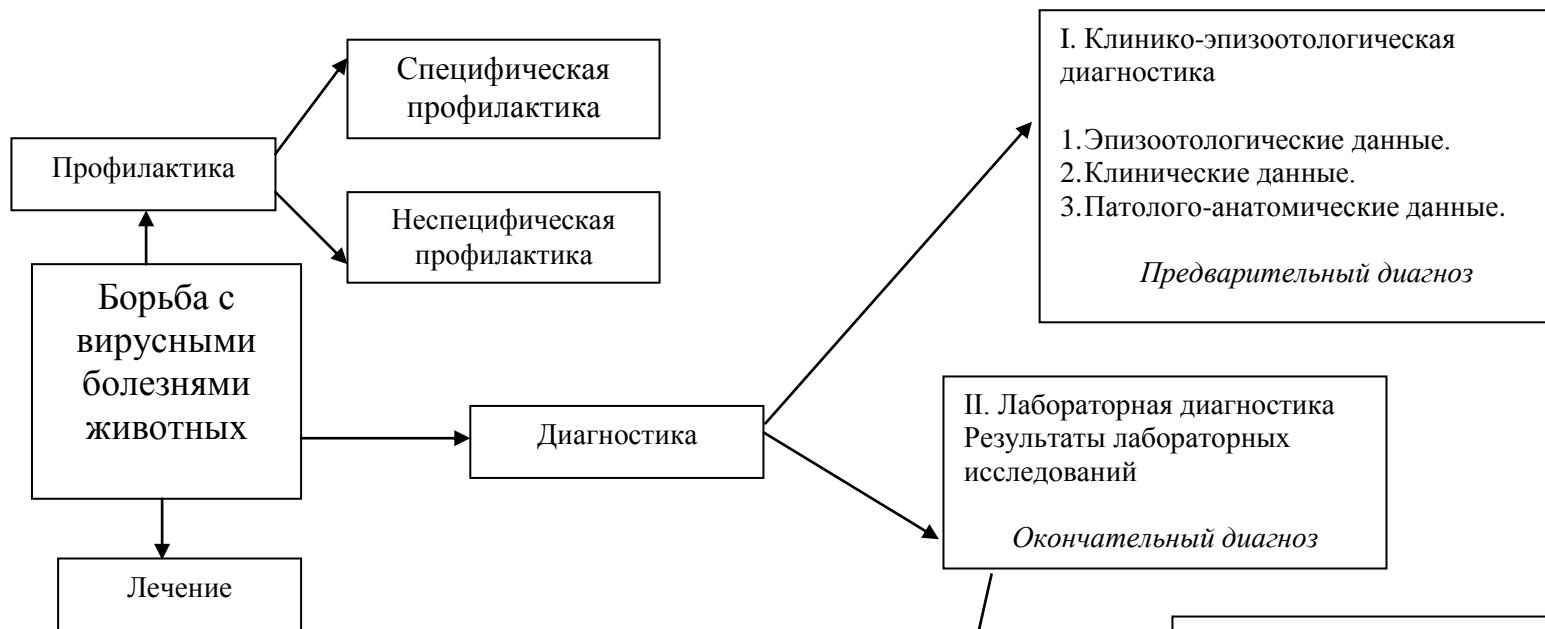
## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова. – М.: КолосС, 2007. – 424 с.
2. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э.А. Преображенская. – М.: КолосС, 2006. – 248 с.
3. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология: учебник / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, В.И. Плешакова. – СПб.: Лань, 2010. – 480 с.
4. Инфекционная патология животных / под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова [и др.]. – М.: Академкнига, 2006. – Т. 2. – С. 472–775.
5. Практикум по биотехнологии: учеб. пособие / И.В.Тихонов, В.А. Гаврилов, Д.А. Девришов [и др.]. – М.: Киселева Н.В., 2010. – 330 с.
6. Строганова, И.Я. Вирусные болезни крупного рогатого скота: учеб. пособие / И.Я. Строганова, А.Г. Глотов, Т.И. Глотова; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2011. – 192 с.



**ПРИЛОЖЕНИЯ**

**Борьба с вирусными болезнями животных**



I. От больных животных:

- а) смывы (из глаз, носа, половых органов) (ИРТ, ПГ-3, аденовирусную инфекцию, РС-инфекцию, грипп и др.);
- б) кожные поражения, слизистой оболочки (ящур, оспа и др.);
- в) фекалии (коронно-, ротавирусы и др.);

Смывы из прямой кишки ИРТ, ПГ-3, фекалии и клетки (легкий соскоб слизистой ватно-марлевым тампоном)

- г) кровь:
  - первая и через 1–2 недели вторая;
  - вирус в момент вирусемии (температура тела повышается).

1 мл дист. воды + 1 мл крови (лаковая) можно без антикоагулянтов, лизируется). Сгусток растереть и т. д.

Отбор биологического материала

II. От трупов  
Через 1–2 часа после гибели. Учитываем клиническую картину, получаем кусочки органов 10–20 г:

- 1) регионарные лимфатические узлы;
- 2) селезенка;
- 3) сердце;
- 4) печень;
- 5) легкое и др.

Лабораторные исследования

Приложение 2

42

	I. Обнаружение вируса в биоматериале (индикация)	II. Выделение вируса из биоматериала (изоляция)	III. Идентификация выделенного вируса	IV. Доказательства этиологической роли выделенного вируса (при необходимости)	V. Ретроспективная серологическая диагностика
Экспресс-методы	<p>1. Обнаружение вирионов (методы): – электронная микроскопия; – световая микроскопия (оспа).</p> <p>2. Обнаружение телец-включений: – (Бабеша-Негри при бешенстве и др. включения); – световая микроскопия.</p> <p>3. Обнаружение вирусных АГ: – серологические реакции (РИФ, ИФА, РСК, РДП, РНГА).</p> <p>4. Обнаружение вирусных нуклеиновых кислот: – ПЦР (полимеразная цепная реакция); – ДНК-зонды.</p> <p>5. Обнаружение ГА у гемагглютинирующих вирусов в РГА (но какой, не знаем, используется редко)</p>	<p>Биопроба. <i>На животных:</i> 1) клиника; 2) гибель; 3) патизменения. <i>На куриных эмбрионах:</i> 1) гибель; 2) патизменения ХАО (бешенство, оспа); 3) РГА (ВБН, грипп, ПГ-3 и др.). <i>На культурах клеток:</i> 1) ЦПД; 2) РГАд; 3) бляшки и др.</p>	<p>1. Серологические реакции: набор эталонных сывороток антител (РН, РТГА, РТГАд, РСК, РНГА, РИФ, РИД, ИФА).</p> <p>2. ПЦР (полимеразная цепная реакция)</p>	<p>Исследуют парные сыворотки крови в серологических реакциях с выделенным вирусом в качестве (АГ), а в качестве АТ (антител) – полученные сыворотки крови от животных, которые явились источником патматериала.</p> <p>Повышение титра АТ во вторых пробах сыворотки по сравнению с первыми в 4 и более раз говорит о том, что причиной инфекции стал вирус, титр к которому возрос (РН, РНГА, РИФ, РДП, ИФА, РСК).</p> <p>Реакция нейтрализации до рога, но эталонная</p>	<p>Для этой цели используют парные сыворотки крови, которые исследуют в соответствующих серологических реакциях на наличие антител. В этом случае в качестве антигена используют эталонные штаммы вирусов, а в качестве антител к исследуемому антигену – парные сыворотки крови.</p> <p>Повышение титра АТ во вторых пробах сывороток по сравнению с первыми пробами в 4 и более раз свидетельствует, что вспышку заболевания вызвал вирус, титр АТ к которому возрос (РН, РНГА, РТГА, РИФ, РДП, ИФА, РСК)</p>
Ретроспективные методы	<p>6. Обнаружение инфекционной формы вируса: – биопроба (на животных, куриных эмбрионах, культурах клеток); – естественно восприимчивые животные</p>				

# **ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ**

*Методические указания к лабораторным занятиям*

**Строганова Ирина Яковлевна**

*Редактор И.В. Пантелеева*

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.

Подписано в печать 3. 05. 2018. Формат 60×90/16. Бумага тип. № 1.

Печать – ризограф. Усл. печ. л. 3,0. Тираж 56 экз. Заказ № 116

Редакционно-издательский центр Красноярского государственного аграрного университета  
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117