ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

П. И. Барышников, В. В. Разумовская



gost.e-ecolog.ru



· САНКТ-ПЕТЕРБУРГ ·
· МОСКВА ·
· КРАСНОДАР ·
· 2015 ·

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Составители:
П. И. Барышников,
В. В. Разумовская

Издание второе, исправленное

ДОПУЩЕНО
Министерством сельского хозяйства РФ в качестве учебного пособия для студентов вузов, обучающихся по направлению подготовки (специальности) «Ветеринария»

ДОПУЩЕНО
УМО вузов РФ по образованию в области зоотехнии и ветеринарии в качестве учебного пособия для студентов вузов, обучающихся по направлению подготовки (специальности) «Ветеринария» (квалификация (степень) «Ветеринарный врач»)

ЛАНЬ®
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ • МОСКВА • КРАСНОДАР •
2015 •

ББК 48.7я73
Л 12

Л 12 Лабораторная диагностика вирусных болезней животных / Сост. П. И. Барышников, В. В. Разумовская: Учебное пособие. — 2-е изд., испр. — СПб.: Издательство «Лань», 2015. — 672 с.: ил. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-1882-4

Учебное издание содержит действующие методические указания, наставления и инструкции по лабораторной диагностике вирусных болезней животных, утвержденные Министерством сельского хозяйства СССР, РФ и Россельхознадзором РФ. Документы систематизированы по видам животных, в большинстве прошли многолетнюю аппробацию в Алтайской краевой ветеринарной лаборатории и включены в «Перечень нормативной документации, разрешенной для использования в государственных ветеринарных лабораториях при диагностике болезней животных, рыб, пчел, а также контроля безопасности сырья животного и растительного происхождения» (по состоянию на июль 2011 г.). Приводятся предметный указатель и библиографический список.

Предназначено для студентов, обучающихся по специальности «Ветеринария» и направлению «Ветеринарно-санитарная экспертиза», ветеринарных врачей и лаборантов ветеринарных лабораторий.

ББК 48.7я73

Рецензенты:
И. И. ГУСЛАВСКИЙ — доктор ветеринарных наук, профессор кафедры микробиологии, эпизоотологии, паразитологии и ВСЭ Алтайского государственного аграрного университета;
В. И. ПЛЕШАКОВА — доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой ветеринарной микробиологии, вирусологии и иммунологии Омского государственного аграрного университета им. П. А. Столыпина;
В. А. СИНИЦЫН — доктор ветеринарных наук, зав. отделом ФГБУ «Новосибирская межрегиональная ветеринарная лаборатория».

Обложка Е. А. ВЛАСОВА

© Издательство «Лань», 2015
© Коллектив авторов, 2015
© Издательство «Лань», художественное оформление, 2015

1.
БОЛЕЗНИ, ОБЩИЕ ДЛЯ ВСЕХ ИЛИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

ЯЩУР

1.1.
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЯЩУРА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ

(утверждены 10 февраля 1983 г., № 115-6а)

1. Общие положения.

1.1. Настоящие методические указания предназначены для научно-исследовательских и других учреждений, занимающихся лабораторной диагностикой ящура и изучением динамики формирования гуморального иммунитета у переболевших или вакцинированных животных.

1.2. Выявление, идентификация и количественное определение антител к вирусу ящура проводится в два этапа, выполняемых одновременно или последовательно:

- выявление и определение уровня постинфекционных антител с помощью непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ);
- идентификация типовой специфичности и количественное определение антител с помощью реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД).

1.3. Выявление постинфекционных антител в НРИФ основано на способности сыворотки крови переболевших животных давать специфическое свечение, в отличие от сыворотки вакцинированных или интактных животных, не дающей специфического свечения.

1.4. Сущность НРИФ заключается в формировании зоны специфической преципитации вирусных антигенов антителами, включенными в состав агарового геля. Данная реакция является типоспецифичной. По мере снижения

концентрации специфических антител при разведении сыворотки интенсивность зоны преципитации уменьшается, а размер — увеличивается.

2. Взятие и пересылка материала на исследование.

2.1. Материалом для исследования на наличие антител к вирусу ящура служат сыворотки крови животных, подозреваемых в переболевании ящуром или другими везикулярными болезнями либо вакцинированных против них.

2.2. Для достоверного выявления антител и определения их типовой специфичности пробы сыворотки крови должны быть взяты не ранее 7 дней с момента появления у животных признаков везикулярного заболевания или проведения вакцинации. На исследование следует направлять 5...10 проб сыворотки от каждой возрастной группы животных. При сомнительных результатах первичного исследования необходимо отобрать кровь повторно от тех же животных спустя 7...10 дней.

2.3. Кровь у крупного и мелкого рогатого скота берут из яремной вены, а у свиней — из ретробульбарного венозного синуса. Сыворотку, полученную общепринятым методом, консервируют антибиотиками (по 500 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина) или замораживают при −20°С. На исследование сыворотку (не менее 5 мл от каждого животного) направляют в термосе со льдом.

2.4. На партию проб сыворотки оформляют сопроводительный документ, в котором должно быть указано:

- наименование и адрес хозяйства, где отобраны сыворотки;
- вид животных, от которых взяты сыворотки;
- количество и номера проб, а также дата их взятия;
- причина направления сывороток на исследование;
- краткие клинические признаки болезни, время их проявления и предполагаемый диагноз;
- дата вакцинации и характеристика использования вакцин;
- фамилия и должность лица, направившего сыворотки на исследование.

3. Аппаратура, материалы, реактивы, растворы и сыворотки.

3.1. Для исследования сыворотки в НРИФ применяют:

- вентилятор настольный;
- весы лабораторные;
- камеру влажную (стерилизатор или кювета с крышкой, на дно которых кладут смоченную водой фильтровальную бумагу);
- микроскоп люминесцентный;
- потенциометр или pH-метр;
- термостат электрический с автоматическим регулятором;
- препараты из культуры клеток, содержащие антиген вируса ящура (готовят во Всероссийском научно-исследовательском ящурном институте в соответствии с «Приложением»);
- препараты из неинфицированной культуры клеток (для контроля);
- пипетки вместимостью 1 и 5 мл с ценой деления 0,1 мл;
- пробки резиновые;
- флаконы пенициллиновые;
- воду дистиллированную;
- буферный физиологический раствор (БФР) с pH 7,2...7,4. Вначале готовят раствор А (9,08 г калия фосфорнокислого однозамещенного, х. ч., растворяют в воде объемом до 1 л) и раствор Б (9,48 г натрия фосфорнокислого двузамещенного безводного, х. ч., или 23,75 г $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ растворяют в воде объемом до 1 л).

Для приготовления 1/15 М раствора фосфатного буфера с pH 7,2...7,4 смешивают 280 мл раствора А и 720 мл раствора Б. Для получения БФР с тем же pH берут 300 мл раствора фосфатного буфера и 700 мл 0,85%-ного раствора натрия хлористого, х. ч. Растворы готовят на кипяченой дистиллированной воде. Перед употреблением проверяют pH полученного БФР. При отклонении pH в щелочную сторону добавляют раствор А, в кислую — раствор Б;

- альбумин бычий, меченный родамином;
- сыворотки крови крупного рогатого скота, овец и свиней, не содержащие постинфекционных антител к ви-

русу ящура, т. е. нормальные или негативные сыворотки (для контроля);

- сыворотки крови крупного рогатого скота, овец и свиней — ящурных реконвалесцентов, т. е. позитивные сыворотки (для контроля);
- сыворотки крови крупного рогатого скота, овец и свиней, привитых инактивированной вакциной, т. е. сыворотки, содержащие поствакцинальные антитела (для контроля);
- сыворотки сухие кроличьи люминесцирующие против глобулинов быка, барана и свиньи (антивидовые).

Рабочие разведения люминесцирующей антивидовой сыворотки и бычьего альбумина, меченного родамином, готовят согласно наставлениям, прилагаемым к этим реактивам Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (Москва), который их выпускает.

3.2. Для постановки РРИД применяют:

- бани водяные 100 и 56°С;
- pH-метр;
- пробирки серологические с резиновыми пробками;
- штативы для пробирок;
- пипетки серологические вместимостью 1, 2, 5 и 10 мл;
- колбы, цилиндры и другую посуду различной емкости;
- предметные стекла 26×76 мм;
- камеру герметическую или эксикатор для постановки реакции во влажной атмосфере;
- штамп для изготовления лунок диаметром 4,0 и 7,7 мм;
- уровень;
- осветитель ОИ-19 с синим светофильтром;
- шланги резиновые разных диаметров;
- раствор буферный физиологический (см. п. 3.1);
- воду дистиллированную;
- антигены эталонные 7 типов вируса ящура и других везикулярных болезней (ВВС 0-72 и Т-75, ВЭС А-48 и С-72, ВС «Индиана» и «Нью-Джерси»), изготавливаемые ВНИИЯИ по инструкциям, утвержденным ГУВ МСХ СССР;
- сыворотки эталонные 7 типов ящура и других везикулярных болезней (ВВС 0-72 и Т-75, ВЭС А-48 и С-72, ВС

«Индиана» и «Нью-Джерси»), изготавливаемые ВНИИЯИ по инструкциям, утвержденным ГУВ МСХ СССР, или препараты иммуноглобулинов, выделенных из иммунных сывороток, полученных на инактивированный вирус перечисленных болезней;

- агар белый или импортный фирм «Серва» или «Дифко»;
- азид натрия или кислота карболовая.

4. Требования к условиям проведения исследований.

4.1. Работа по выявлению, идентификации типовой специфичности и количественному определению антител к вирусу ящура может проводиться в условиях обычных ветеринарно-диагностических лабораторий и не требует создания более строгого санитарного режима, поскольку проводится с неинфекционными материалами.

5. Проведение исследований по выявлению и определению уровня постинфекционных антител с помощью НРИФ.

5.1. Техника проведения НРИФ.

5.1.1. Сыворотки инактивируют при 56°С в течение 30 мин, а затем разводят БФР с pH 7,2...7,4 в соотношениях 1:10 и 1:20.

5.1.2. Препараты располагают в кювете и соответствующим образом маркируют графитовым карандашом на матовом шлифе стекла.

5.1.3. НРИФ состоит из двух этапов.

Первый этап. Препараты, содержащие вирусный антиген, обрабатывают последовательными разведениями испытуемой сыворотки, нанося на них по 2...3 капли сыворотки, начиная с конечного ее разведения, с последующим инкубированием во влажной камере при 37°С в течение 30 мин. На каждое разведение сыворотки берут не менее двух препаратов. Несвязавшиеся антитела сыворотки отмывают в двух порциях (по 10 мин в каждой) БФР с pH 7,2...7,4, охлажденного до 4°С, и подсушивают на воздухе под вентилятором.

Второй этап. Препараты окрашивают смесью рабочих разведений люминесцирующей антивидовой сыворотки

и бычьего альбумина, меченного родамином (по 2...3 капли на препарат). Препараты, обработанные на первом этапе НРИФ сывороткой крупного рогатого скота, допустимо окрашивать люминесцирующей сывороткой против глобулинов барана и наоборот.

После этого препараты, как и на первом этапе реакции, снова инкубируют во влажной камере при 37°С в течение 30 мин, затем отмывают в двух-трех порциях БФР от несвязавшихся антител и ополаскивают в дистиллированной воде (для удаления осадка солей, находящихся в БФР).

5.1.4. Контроли. Для исключения возможных ошибок НРИФ должна сопровождаться следующими контролями:

а) препараты на первом этапе реакции обрабатывают сывороткой ящурных реконвалесцентов с известной иммунофлуоресцентной активностью, т. е. позитивной сывороткой, разведенной БФР в соотношении 1:10 и 1:20 (положительный контроль);

б) препараты на первом этапе реакции обрабатывают нормальной, т. е. негативной сывороткой, разведенной БФР в соотношении 1:10 и 1:20 (отрицательный контроль, в котором специфического свечения не должно быть);

в) при необходимости дифференциации постинфекционных антител от поствакцинальных антител препараты обрабатывают сывороткой от вакцинированных животных в разведениях 1:10 и 1:20 (отрицательный контроль);

г) препараты из неинфицированной культуры клеток обрабатывают теми же реактивами, что и в контроле «а» (отрицательный контроль, используемый, как и контроли «б» и «в», для исключения возможного ложно специфического свечения).

5.2. Люминесцентная микроскопия препаратов.

5.2.1. Вначале микроскопируют контрольные препараты с тем, чтобы убедиться в качестве реактивов и антигенов. Неудовлетворительные контроли делают нецелесообразным исследование и остальных препаратов, т. е. выявление постинфекционных антител в сыворотках в этом случае становится невозможным.

5.2.2. Техника люминесцентной микроскопии. Препараты исследуют под люминесцентным микроскопом в отра-

женном (падающем) свете при объективе ×40, окуляре ×4 (или ×5), возбуждающих светофильтрах ФС, БС и СС и запирающем светофильтре ЖС-18 (или ЖС-19), увеличении бинокулярной насадки ×1,1 (или ×1,6). Детальное описание центрировки и других правил работы люминесцентных микроскопов дано в прилагаемых к ним инструкциях.

5.2.3. При необходимости в ходе исследования проводят фазово-контрастную микроскопию тех же полей зрения препарата, но в проходящем свете (с целью дифференцировки клеточных элементов от посторонних частиц).

5.2.4. До и после исследования препараты можно хранить несколько дней в сухой кювете при 4°С или комнатной температуре в темном месте.

5.3. Критерии специфичности свечения.

5.3.1. Важные критерии, определяющие специфичность свечения в препаратах:

а) цвет должен быть зеленым или изумрудно-зеленым;

б) локализация только цитоплазматическая;

в) интенсивность свечения должна отчетливо превышать таковую соседних неинфицированных клеток, а также клеток в отрицательных контролях;

г) количество светящихся клеток не должно заметно отличаться от числа клеток с таким же зеленым свечением в положительном контроле (см. п. 5.1.4а).

5.3.2. Все другие цвета свечения клеток: серо-зеленый, серый, желтый, розовый или красный (разных оттенков) — не являются специфическими.

5.4. Оценка результатов НРИФ.

5.4.1. Наличие в сыворотке постинфекционных антител определяют путем обнаружения в препаратах клеток со специфическим свечением, сходным с таковым в положительном контроле.

5.4.2. Диагностический результат считают положительным при обнаружении специфического свечения хотя бы в одной из 5...10 сывороток, присланных из данного хозяйства.

5.4.3. Наличие в препаратах яркого серо-зеленого, серого или другого оттенка свечения клеток указывает на сомнительный результат реакции. Это может быть связано

с присутствием в данной сыворотке высокого титра поствакцинальных антител. При сомнительных результатах через 7...10 сут повторно получают и исследуют сыворотку от тех же животных.

5.4.4. Результат НРИФ является отрицательным при отсутствии специфического свечения в препаратах, обработанных обоими разведениями испытуемой сыворотки.

5.5. Титрование постинфекционных антител.

5.5.1. Для определения уровня антител в испытуемой сыворотке проводят ее титрование с помощью НРИФ в следующем порядке:

- испытуемую сыворотку, давшую положительную НРИФ, разводят БФР с pH 7,2...7,4 последовательно 1:40, 1:80, ..., 1:280;
- на препараты из культуры клеток, инфицированной вирусом ящура любого типа, пипеткой наносят вышеуказанные разведения испытуемой сыворотки, начиная с наивысшего;
- дальнейшее исследование проводят по той же схеме, что и при выявлении постинфекционных антител (см. подразделы 5.1...5.4).

5.6. Оценка результатов титрования.

5.6.1. О титре постинфекционных антител в сыворотке судят по предельному ее разведению, которое способно давать положительную НРИФ.

5.6.2. При проведении НРИФ с использованием гомологичных препаратов, т. е. при соответствии типа вирусного антигена в них с типовой принадлежностью антител испытуемой сыворотки, титры антител у животных-реконвалесцентов, выявляемых этой реакцией, как правило, превышают титры вируснейтрализующих антител на 2...3 $\log_2$.

5.6.3. При использовании для титрования гетерологичных препаратов титры постинфекционных антител в сыворотках, как правило, совпадают с титром вируснейтрализующих антител или превышают их на 1...2 $\log_2$.

5.6.4. Выявление специфического свечения в препаратах, обработанных испытуемой сывороткой крупного рогатого скота в разведениях 1:10, 1:20 и 1:40, свидетельствует

об остром переболевании животного ящуром, т. е. о том, что с момента его заболевания прошло около недели.

5.6.5. Наличие специфического свечения в препаратах, обработанных испытуемой сывороткой в разведениях 1:80 и выше, указывает на то, что данная сыворотка взята от животного-реконвалесцента.

5.7. Результаты исследования оформляют в виде протокола, в котором указывают:

- дату исследования;
- наименование и адрес хозяйства, откуда получены сыворотки;
- причину исследования сывороток;
- краткие данные о времени появления заболевания, клинические его признаки, охват животных заболеванием, предполагаемый диагноз, дату проведения вакцинации и др.;
- характеристику испытуемых сывороток (от какого вида животных и когда они взяты, их количество);
- наименование культуры клеток и типа (штамма) вируса ящура, используемых для приготовления препаратов;
- срок и условия хранения препаратов;
- серию, срок годности и рабочие разведения люминесцирующей сыворотки и бычьего альбумина, меченного родамином;
- проведенные контрольные исследования (характеристика контрольных препаратов и контрольных сывороток);
- характер свечения в контролях и препаратах, обработанных разными разведениями исследуемой сыворотки;
- результат реакции по каждой сыворотке и в целом по группе сывороток, полученных из хозяйства (фермы, гурта, отары и т. п.);
- дату официального ответа и адресат.

6. Проведение исследований по типированию и количественному определению постинфекционных и поствакцинальных антител в РРИД.

6.1. Подготовка компонентов реакции.

6.1.1. Агаровый гель готовят по следующей прописи:

- агара — 20 г;
- натрия хлористого — 16 г;
- воды дистиллированной — до 1000 мл.

Смесь перечисленных ингредиентов доводят до кипения. После расплавления агара к нему добавляют 1 мл 50%-ного раствора карболовой кислоты или 1,0 г азида натрия и 0,03 г метилоранжа. Расплавленный агар фасуют во флаконы объемом 50...100 мл или в ампулы объемом 3...6 мл, герметизируют и хранят при +4°С до 12 мес., а при комнатной температуре — до 6 мес.

6.1.2. Каждую пробу испытуемой и эталонной сыворотки сначала разводят 1:5 буферным физиологическим раствором, а затем последовательно с двукратным шагом до 1:320.

При необходимости более точного определения титра антител исследуемую сыворотку разводят не двукратным шагом, а в арифметической прогрессии, например 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 и т. д. Объем каждого разведения зависит от числа эталонных антигенов, с которыми проверяется сыворотка.

Его находят по формуле

$$X = \frac{2a}{b} + 2 \text{ мл},$$

где X — объем разведения сыворотки, мл; a — число эталонных антигенов, с которыми будет исследована сыворотка; b — число антигенов, размещаемых на одной иммунодиффузионной пластинке.

Если в результате получается не целое число, то его округляют в сторону увеличения объема.

Непосредственно перед постановкой реакции все разведения сыворотки нагревают в водяной бане до +50...55°С.

6.1.3. Сухие эталонные антигены регидратируют дистиллированной водой в объеме, указанном на их этикетках.

6.1.4. Сухие эталонные сыворотки и препараты иммуноглобулинов сначала регидратируют дистиллированной водой в объеме, указанном на их этикетках, а затем готовят на буферном физиологическом растворе ряд последователь-

ных двукратных разведений начиная с 1:20, в объемах, как указано в п. 6.1.2.

6.1.5. Подготовка иммунодиффузионных пластинок заключается в следующем: агаровый гель, полученный, как указано в п. 6.1.1, расплавляют в кипящей водяной бане, охлаждают до +50...55°С и смешивают с равными объемами нагретых до этой же температуры испытуемых сывороток, разведенных, как указано в п. 6.1.2. Полученные жидкости тщательно смешивают и немедленно наносят по 4 мл на обезжиренные предметные стекла, установленные по уровню на строго горизонтальный стол.

Примечание. Обезжиривают предметные стекла смесью равных объемов спирта и эфира или хромпиком по методике подготовки стеклопосуды в вирусологических целях.

После затвердения геля пластинки выдерживают при комнатной температуре на воздухе 1 ч или во влажной камере — 18...20 ч. В затвердевшем агаре специальным штампом на каждом стекле вырезают 4 лунки диаметром 4 мм или 3 лунки диаметром 7,7 мм, что зависит от активности эталонных антигенов. Если титр их активности в РСК выше 1:16, то делают лунки диаметром 4 мм, а если ниже — 7,7 мм.

6.1.6. Лунки иммунодиффузионных пластинок заполняют эталонными антигенами, не допуская их переполнения и растекания по поверхности агара. Затем пластинки помещают во влажную камеру или в эксикатор и помещают в термостат при +37°С. Предварительный учет реакции проводят через 6...7 ч после постановки. Окончательно результаты учитывают через 18 ч.

6.1.7. Реакцию учитывают по наличию зоны специфической преципитации. Для ее выявления применяют косое освещение иммунодиффузионных пластинок осветителем ОИ-19. Положительная реакция характеризуется образованием кольца преципитации в виде опалесцирующей или вуалевой зоны вокруг лунки с антигеном, гомологичным возбудителю, вызвавшему заболевание, или вакцинному штамму.

Примечание. В отдельных случаях возможно появление зоны опалесценции вокруг лунок с гетерологичными антигенами. Для исключения ложноположительных результатов пластинки с такими зонами следует на 18...20 ч поместить в воду, после чего учесть результаты повторно.

6.1.8. Учет результатов.

Антитела, обнаруженные в испытуемой пробе сыворотки, относят к тому серотипу, с антигеном которого они дали положительную реакцию. Их предельным титром считают максимальное разведение испытуемой сыворотки, с которым наблюдается положительная реакция.

Титры сыворотки, полученной от вакцинированных животных, зависят от активности использованной вакцины, кратности и сроков ее применения и физиологических характеристик животного (возраст, вид). У однократно вакцинированного против ящура взрослого крупного рогатого скота обычно титры через 30...90 сут после введения вакцины лежат в диапазоне 1:20...1:80, а после двукратной иммунизации в эти же сроки они возрастают до 1:80...1:160. Титры у молодняка, как правило, в 2...3 раза ниже, чем у взрослых животных. У свиней и овец титры ниже, чем у крупного рогатого скота.

После переболевания животных титры значительно выше, чем после вакцинации, и обычно превышают разведение 1:160.

6.1.9. Результаты исследования сыворотки в РРИД протоколируют в специальных журналах, в соответствии с п. 5.7.

7. Общее заключение.

7.1. Выявление в НРИФ специфического свечения свидетельствует о наличии в испытуемой сыворотке постинфекционных антител, т. е. о переболевании животного ящуром.

7.2. Исследование реконвалесцентных сывороток в РРИД позволяет определить типовую специфичность антител, а по ним ретроспективно поставить диагноз на заболевание. Исследование поствакцинальных сывороток в этой реакции позволяет определить типовую специфичность и состо-

яние гуморального иммунитета, а также эффективность применяемых средств активной иммунизации против ящура и других везикулярных болезней животных.

Общая продолжительность исследования сыворотки составляет 18 ч, в том числе дифференциация постинфекционных антител от поствакцинальных с помощью НРИФ — 4 ч, типирование антител и определение титра их активности с помощью РРИД — 18 ч.

ПРИЛОЖЕНИЕ к «Методическим указаниям по выявлению, идентификации типовой специфичности и количественному определению антител к вирусу ящура в сыворотке крови животных».

Способ приготовления препаратов (антигенов) для НРИФ.

1. Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды.

1.1. Для приготовления препаратов дополнительно, кроме указанного в п. 3.1 «Методических указаний», необходимо следующее:

- автоклав;
- бокс стерильный;
- горелка газовая или спиртовая;
- круг каждачный;
- холодильник электрический бытовой или на –20°С;
- шкаф вытяжной;
- шкаф сушильный электрический лабораторный;
- центрифуга лабораторная стационарная с набором центрифужных пробирок;
- банки стеклянные вместимостью 0,5...1 л;
- матрасы вместимостью 1...1,5 л;
- пипетки пастеровские;
- стекла предметные;
- ацетон, осч, или производства ГДР, ЧССР;
- спирт этиловый ректификованный или спирт гидролизный;
- эфир для наркоза;
- версен (0,02%-ный раствор);
- вирус ящура (любого типа или штамма), адаптированный к культуре клеток, с титром около 10 $ТЦД_{50}$/мл;

- раствор Хенкса (без индикатора);
- среда питательная поддерживающая (среда Игла для перевиваемой культуры клеток, 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хенкса или Эрла — для первичных культур клеток);
- среда питательная ростовая, т. е. соответствующая поддерживающая среда с 10%-ным содержанием сыворотки крови крупного рогатого скота;
- суспензия или монослой первичной культуры клеток бычьей или свиной почки (БП, СП) или перевиваемой культуры клеток ВНК-21;
- трипсин (0,25%-ный раствор).

1.2. Растворы и среда должны быть стерильными. Посуда должна быть обработана общепринятым способом, а предметные стекла — по следующей методике. Заранее на одном из концов каждого предметного стекла с помощью наждачного круга делают матовый шлиф шириной около 1 см, потом стекла тщательно моют в нейтральных детергентах, ополаскивают дистиллированной водой и хранят в смеси спирт-эфира (поровну). Перед употреблением их протирают насухо, проводят через пламя горелки и охлаждают. После употребления стекла вновь обрабатывают по той же схеме.

2. Приготовление препаратов.

2.1. Препараты готовят путем инфицирования однослойной культуры клеток вирусом ящура.

2.2. Однослойные культуры клеток выращивают в матрасах вместимостью 1...1,5 л общепринятым способом. При этом монослой клеток ВНК-21 формируется через 1...2 сут, СП — через 3...5, БП — через 5...7 сут.

2.3. Для инфицирования выращенной культуры клеток используют оптимальную дозу вируса, определяемую накануне путем титрования на соответствующей культуре клеток. Необходимо, чтобы эта доза вируса вызывала в указанной культуре лишь частичную деструкцию монослоя через 18...24 ч инкубации.

2.4. Культуру клеток инфицируют в следующей последовательности:

- из матраса с выращенным монослоем удаляют ростовую питательную среду и ополаскивают свежей поддерживающей средой;
- в матрас вносят соответствующую дозу вируса и 150...200 мл поддерживающей среды, ставят в термостат при 37°С на 16...20 ч и периодически проводят световую микроскопию монослоя (для контроля ЦПД вируса).

2.5. Препараты готовят при наличии в монослое 10...30% пораженных клеток, т. е. при начальных признаках ЦПД вируса, когда при световой микроскопии обнаруживают единичные очаги округления и деструкции клеток, а также отслоение некоторых из них от стекла.

2.6. Препараты готовят на специально обработанных предметных стеклах (см. п. 1.2) в следующей последовательности:

- из матраса удаляют поддерживающую питательную среду;
- клетки монослоя «снимают» со стекла и дезагрегируют по общепринятому способу с помощью 30...50 мл раствора трипсина или версена, подогретого до 37°С;
- диспергированные клетки центрифугируют при 800...1000 об/мин в течение 5...10 мин;
- полученный осадок ресуспендируют в 5...10-кратном объеме раствора Хенкса (без индикатора);
- клеточную суспензию, содержащую около 10 клеток/мл, наносят с помощью пастеровской пипетки на предметные стекла в виде серии из 2...3 капель диаметром 0,5...0,7 см и расстояния между ними около 1 см;
- жидкость из капель суспензии высушивают на воздухе (под вентилятором) до получения на стеклах беловатого осадка, состоящего из клеток.

Из одного матраса таким образом можно приготовить 200...400 препаратов, которые должны быть тонкими, т. е. содержать не более одного слоя клеток.

2.7. После высушивания препараты сразу же или на другой день фиксируют в течение 10...20 мин в ацетоне, охлажденном от +4°С до −10°С. Фиксатор при этом должен свободно циркулировать между предметными стеклами.

2.8. После фиксации препараты высушивают на воздухе (в вытяжном шкафу), затем прогревают при 56°С в течение 4 сут (для инактивации вируса) и хранят до использования в закрытых фильтровальной бумагой банках при +4°С или −20°С, периодически проверяя их качество с помощью НРИФ.

2.9. Для контроля подобным же образом готовят препараты из аналогичной, но неинфицированной культуры клеток.

Методические указания разработаны Всесоюзным научно-исследовательским ящурным институтом МСХ СССР (А. М. Рахманов, Х. А. Шажко, Н. В. Кудрявцев, Г. А. Кудрявцева, В. А. Мищенко).

КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ТЕРМИНОВ

Антигены (анти + греч. *genes* — порождающий) — чужеродные для организма высокомолекулярные органические вещества коллоидной структуры (белки, белково-липидные и белково-полисахаридные комплексы), способные при поступлении (введении парентерально) вызывать синтез особых глобулинов-антител и вступать в специфическое взаимодействие с ними.

Антитела (анти. + тело) — противотела — специфические белки (иммуноглобулины), образующиеся в организме под воздействием антигенов. Они накапливаются в сыворотке крови и тканях, вступают в специфическую связь с соответствующими антигенами и разрушают или обезвреживают их.

Биологическая проба (биопроба) — один из методов диагностики инфекционных болезней с помощью заражения патологическим материалом подопытных животных (куриных эмбрионов, культур клеток) и их исследования.

Вирион — полноценная внеклеточная вирусная частица.

Вирусовыделение — выделение возбудителей инфекции из организма больного животного или вирусоносителя.

Вирусоносительство — наличие возбудителя инфекции в определенных органах и тканях клинически здорового животного, не сопровождающееся иммунологической перестройкой организма.

Вирусы (лат. *virus* — яд) — облигатные внутриклеточные паразиты, отличающиеся от растительных и животных организмов малыми размерами, отсутствием клеточного строения и автономного метаболизма, наличием только одного типа нуклеиновой кислоты и дезъюнктивным способом размножения.

В. безоболочечные — вирусы, в структуре которых отсутствует липопротеидная оболочка.

В. оболочечные — вирусы, в структуре которых присутствует липопротеидная оболочка.

Вирусоскопия (вирусы + *skopeo* — смотрю, наблюдаю) — метод микроскопического изучения морфологии вирусов.

Гемагглютинация (греч. *haima* — кровь + *agglutinatio* — склеивание) — склеивание и выпадение в осадок эритроцитов под воздействием вирусов, бактерий, токсинов и др., способных адсорбироваться на поверхности эритроцитов, а также гемагглютининов.

Гемадсорбция (греч. *haima* — кровь + *adsorbtio* — поверхностное поглощение) — способность культур клеток, зараженных вирусами, адсорбировать эритроциты различных животных, что объясняется включением в плазматическую мембрану синтезирующихся вирусных белков.

Диагностика (греч. *diagnostikos* — способный распознавать) — раздел клинической ветеринарии о методах исследования животных для распознавания их болезней и состояния организма с целью назначения необходимого лечения и профилактических мероприятий.

Диагностический набор — набор стандартных препаратов, используемых для постановки диагноза (антиген, специфическая и контрольная сыворотки и др.).

ДНК-зондов метод — метод генодиагностики, основанный на способности меченой одноцепочечной молекулы ДНК взаимодействовать с комплементарной ей молекулой нуклеиновой кислоты определенного вируса с образованием двухцепочечной структуры.

ДНК-содержащие вирусы — вирусы, имеющие один тип нуклеиновой кислоты — ДНК, у большинства она представлена двухцепочечной структурой, у некоторых — одной цепью.

Идентификация (лат. *identifico* — отождествляю) — признание тождественности, опознание-определение видовой (типовой) принадлежности микроорганизма на основании всестороннего изучения его свойств.

Иммуноферментный анализ — группа методов, позволяющих выявлять комплекс антиген — антитело с помощью субстрата, который расщепляется ферментом (пероксидазой, щелочной фосфатазой и др.) с появлением окрашивания.

Инактивация вирусов (лат. *inactivus* — неактивный) — уничтожение инфекционной активности вирусов путем повреждения генома физическим или химическим воздействием.

Индикация возбудителя инфекции (лат. *indicatio* — указание) — выявление и идентификация патогенных микроорганизмов в различных объектах.

Инокуляция возбудителя (лат. *inoculatio* — прививка) — введение возбудителя путем инъекции (искусственное заражение или внесение его в организм животного членистоногими переносчиками при укусах).

Консервирование вирусов (лат. *conservare* — сохранять) — общее название методов воздействия физическими и (или) химическими факторами на какие-либо объекты с целью длительного сохранения в них вирусов.

Контаминация (лат. *contaminatio* — смешение) — обсеменение поверхности тела животного, предметов ухода, почвы, воды, кормов, биопрепаратов и других объектов патогенными микроорганизмами.

Культивирование вирусов — выращивание вирусов в искусственных условиях.

Культуры клеток (клеточные культуры) — клетки многоклеточного организма, живущие вне его в искусственно созданных условиях среды.

Куриный эмбрион — оплодотворенное куриное яйцо, выдержанное в инкубаторе.

Лабораторные животные — животные, используемые в лабораториях при проведении исследований (мыши, крысы, кролики, морские свинки, хомяки, голуби и др.).

Лиофилизация (греч. *lyo* — растворяю + *phileo* — люблю) — высушивание предварительно замороженного материала в глубоком вакууме.

Моноклональные антитела — строго специфические антитела, способные выявить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигурации молекул, являются продуктом отдельных клонов антителопродуцирующих клеток.

Парные сыворотки — сыворотки, взятые в самом начале заболевания и 2...3 недели спустя. Повышение титра антител в 4 раза и более считается основой положительной реакции.

Пассаж (фр. *passage* — переход) — последовательное заражение восприимчивых объектов (животные, куриные эмбрионы, культуры клеток) микроорганизмами.

Полимеразная цепная реакция (от англ. *Polymerase Chain Reaction*, ПЦР) — метод генодиагностики, основанный на многократном увеличении копий строго определенных фрагментов

молекулы ДНК вируса при помощи фермента термостабильной ДНК-полимеразы.

Реакция гемагглютинации (РГА) — метод обнаружения и идентификации вирусов, основанный на способности многих вирусов, обладающих тканевым тропизмом, агглютинировать эритроциты определенных видов животных.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) (лат. *fluorescens* — светящийся) — серологическая реакция, основанная на взаимодействии антиген — антитело, при этом один из компонентов, участвующий в реакции, связан с флуоресцирующим красителем.

Реакция нейтрализации (РН) — метод идентификации вируса, основанный на феномене потери им инфекционности в результате взаимодействия со специфическими антителами.

Реакция связывания комплемента (РСК) — метод серологического исследования, основанный на способности образующегося комплекса антиген — антитело связывать комплемент, что выявляется по отсутствию гемолиза при добавлении гемолизина и эритроцитов.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) — метод идентификации вируса или выявления противовирусных антител в сыворотке крови, основанный на феномене отсутствия агглютинации эритроцитов вирусом, в присутствии специфических к нему антител.

РНК-содержащие вирусы — вирусы, имеющие один тип нуклеиновой кислоты — РНК, у большинства она представлена одной цепью, у некоторых — двухцепочечной структурой.

Сероварианта — самостоятельная группа внутри определенного вида и серогруппы (серотипа) микроорганизмов, обусловленная наличием антигенов, отличающихся от антигенов других микроорганизмов этого вида и серогруппы (серотипа), что выявляется с помощью серологических реакций.

Серогруппа (серотип) — самостоятельная группа внутри определенного вида микроорганизмов, обусловленная наличием антигенов, отличающихся от антигенов других микроорганизмов этого вида, что выявляется с помощью серологических реакций.

Серологические реакции — реакции, широко используемые при постановке диагноза инфекционных болезней, методы обнаружения антител и антигенов в крови и других тканях.

Сыворотка крови (лат. *serum* — сыворотка + *sanguis* — кровь) — составная часть крови, представляющая собой плазму, из которой удалены форменные элементы и фибрин в процессе свертывания крови.

Тельца включения — своеобразные морфологические образования, обнаруживаемые в цитоплазме или ядрах клеток определенных тканей при некоторых вирусных инфекциях и состоящие из скопления вирионов и вирусных белков.

Термолабильность (греч. *thermos* — теплый + лат. *labilis* — нестойкий) — неустойчивый к тепловому воздействию, изменяющийся при нагревании.

Термостабильность (греч. *thermos* — теплый + лат. *stabilis* — неизменный) — сохраняющий свои свойства при нагревании.

Титр вируса — концентрация инфекционных единиц вируса в определенном объеме материала.

Цитопатогенное действие вирусов (ЦПД, цитопатический эффект) — специфическая морфологическая деструкция (разрушение) и функциональная патология зараженных вирусами клеток в культурах.

Штамм (нем. *stamm* — род, корень) — культура микроорганизмов одного вида с одинаковыми морфологическими и биологическими свойствами.

Элементарные тельца — см. **Вирион (2, 3).**

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лабораторные исследования в ветеринарии. Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни : справочник / под ред. Б. И. Антонова. — М. : Агропромиздат, 1987. — 240 с.
2. *Бакулов, И. А.* Эпизоотологический словарь-справочник / И. А. Бакулов, Г. Г. Юрков, В. А. Ведерников [и др.]. — М. : Россельхозиздат, 1986.
3. *Нымм, Э. М.* Словарь ветеринарных микробиологических и вирусологических терминов / Э. М. Нымм, К. А. Петерсон, Э. А. Аавер [и др.]. — М. : Росагропромиздат, 1989.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агар мясо-пептонный (МПА) *101, 109, 125, 326, 387, 444, 456, 476, 483, 542, 588*
Альбумин бычий *7, 226, 618*
Аппарат Кинга *126, 480*

Бульон мясо-пептонный (МПБ) *78, 101, 109, 125, 326, 444, 456, 476, 483, 496, 542, 588*
— **триптозо-фосфатный** *519*
Буфер вероналовый *35, 375*
— **боратный** *148*
— **фосфатно-солевой** *174, 315, 328, 561, 604*
— **калий-фосфатный** *231, 236, 407*
— **карбонатно-бикарбонатный** *335, 561, 604, 618*

Гемолизин *25, 114, 300, 369, 507*
Гемолитическая система (гемсистема) *25, 116, 216*

Жидкость Руге *106, 446*
— **Карнуа** *108*

Иммуноасцитическая жидкость (ИАЖ) *84*

Комплемент *27, 116, 216, 300, 370, 507*

Метод вирусоскопии *99, 443, 548*
— **Кербера** *66*
— **иммуноферментного анализа (ИФА)** *88, 159, 173, 228, 233, 244, 314, 328, 335, 349, 406, 409, 436, 561, 603, 609, 617*
— **кофал-теста** *514*
— **перекрестного иммунитета** *64*
— **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** *180, 253, 307, 342, 416, 425, 625*
— **Рида и Менча** *66, 242, 297, 324, 380, 394, 500, 523, 552, 556*
— **электронной микроскопии** *327, 593*

Окраска гистопрепаратов по Ленцу *80*
— **Турбиной** *584*
— **Туревичу** *81, 584*
— **мазков по Борману — Гайнуллиной** *74*
— **Михину** *74*
— **Морозову** *100, 446*
— **Муромцеву** *73*
— **Пашену** *100, 447*
— **Селлерсу** *74*

Перевиваемая линия почки свиньи (СПЭВ) *70, 386, 392*

— культура клеток ВНК-*21* *18*, *110*
— культура клеток почки поросенка (РК-*15*) *289*, *392*
Первично-трипсинизированная культура клеток почки свиньи (ПЭС) *70*, *141*, *386*
— почки эмбриона коров (ПЭК) *141*, *218*, *239*
— селезенки эмбриона коров (СЭК) *218*
— легкие эмбриона коров (ЛЭК) *218*
— тестикулов бычка (ТБ) *218*, *239*
— почка ягненка *110*

Раствор *30-50*%-ного стерильного глицерина *21*, *72*, *100*, *108*, *385*, *482*, *588*, *615*
— азида натрия *600*
— азотнокислого серебра *106*, *446*
— Альсевера *55*, *271*, *361*
— бис-диазобензидина *55*
— борно-боратный буферный *576*
— бромистого этидия *180*, *253*, *306*, *342*, *416*, *625*
— версена *17*, *69*, *296*
— гексаметафосфата натрия *215*
— забуференый физиологический (ЗФР) *7*, *298*, *325*, *353*, *386*, *399*, *563*, *596*
— лимоннокислого натрия *127*, *135*, *402*, *448*, *458*, *469*, *476*, *535*
— мединал-вероналовый *83*, *569*
— мертиолята *376*, *600*
— натрия хлористого *7*, *171*, *215*, *269*, *276*, *287*, *352*, *376*, *392*, *571*, *611*
— трипсина *18*, *69*, *295*
— физиологический *21*, *54*, *78*, *83*, *101*, *110*, *127*, *134*, *212*, *236*, *257*, *263*, *265*, *303*, *364*, *367*, *419*, *428*, *444*, *448*, *455*, *469*, *475*, *482*, *507*, *535*, *542*, *547*, *554*, *616*, *630*
— фосфатно-буферный *7*, *21*, *54*, *77*, *109*, *215*, *229*, *234*, *271*, *294*, *322*, *353*, *358*, *362*, *367*, *386*, *448*, *502*, *507*, *591*, *620*
— формалина *86*, *100*, *108*, *482*, *503*, *537*, *617*
— Хенкса *18*, *70*, *87*, *141*, *211*, *240*, *296*, *323*, *377*, *387*, *486*, *492*, *535*, *589*, *616*
— хромоген-субстратный *318*, *332*, *338*, *353*, *564*, *606*
— Эванса *299*
— Эдингтона *108*
— Эрла *18*, *296*, *589*
Реакция гемагглютинации (РГА) *127*, *135*, *221*, *270*, *359*, *403*, *449*, *459*, *472*, *477*, *543*, *597*
— гемадсорбции (РГАд) *142*, *220*
— диффузионной преципитации (РДП) *4*, *75*, *118*, *145*, *214*, *268*, *280*, *376*, *483*, *488*, *493*, *500*, *536*, *545*, *552*, *599*
— длительного связывания комплемента (РДСК) *113*
— иммунодиффузии (РИД) *154*, *170*, *276*
— иммунофлуоресценции (РИФ) *77*, *112*, *142*, *212*, *242*, *262*, *268*, *298*, *322*, *378*, *385*, *516*, *552*, *591*
— иммуноосмофореза *84*
— иммуноэлектроосмофореза (РИЭОФ) *569*, *573*
— нейтрализации (РН) *69*, *86*, *143*, *227*, *241*, *324*, *379*, *389*, *393*, *395*, *464*, *493*, *497*, *522*, *543*, *548*
— нейтрализации вирусных гемагглютининов (РНВГ) *226*
— непрямой гемагглютинации (РНГА) *83*, *227*, *325*, *494*, *501*, *516*

— непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) *5, 112, 292, 322*
— пассивной гемагглютинации (РПГА) *53*
— подавления иммунофлуоресценции *213, 386*
— радиальной иммунодиффузии (РРИД) *5, 276*
— серозащиты (РЗ) *65*
— связывания комплемента (РСК) *24, 35, 215, 268, 299, 368, 507*
— угнетения связывания комплемента (РУСК) *59*
— торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА, РЗГА) *125, 135, 144, 221, 262, 265, 272, 357, 361, 399, 448, 457, 477, 597*
— гемадсорбции (РТГАд) *142, 220, 262*
— непрямой гемагглютинации (РТНГА) *225*

Среда *199, 323, 386, 486, 518, 540, 590*
— 0,5%-ногогидролизаталактальбумина *18, 70, 110, 240, 323, 386, 486, 518, 540, 589*
— 5%-ногогемогидролизата *386*
— Игла *18, 70, 110, 486, 518, 540, 590*
— Игла (МЕМ) *289, 393*
— Китта-Тароцци *326, 542*
— поддерживающая *18, 323, 386, 393, 486, 518, 540, 590*
— ростовая *18, 296, 393, 486, 518, 590*

Тельца Бабеша — Негри *74*
Термолабильные ингибиторы *126, 403, 449, 480*
Термостабильные ингибиторы *126, 480*
Тканевая цитопатическая доза (ТЦД) *18, 70, 87, 143, 380, 394, 544*

Цитопатическое действие (ЦПД) *19, 70, 87, 110, 143, 219, 241, 324, 380, 388, 394, 486, 544*

Эритроцитарный диагностикум *55, 83, 325*

СОДЕРЖАНИЕ

1. Болезни, общие для всех или нескольких видов животных 5
Ящур 5
1.1. Методические указания по выявлению, идентификации типовой специфичности и количественному определению антител к вирусу ящура в сыворотке крови животных (утверждены 10 февраля 1983 г., № 115-6а) 5
1.2. Методические указания по выделению и идентификации штаммов вируса ящура (одобрены и рекомендованы 15 октября 1973 г., б/н) 20
Бешенство 72
1.3. Методические указания по лабораторной диагностике бешенства (утверждены 27 февраля 1970 г., б/н) 72
Болезнь Ауески 82
1.4. Методические указания по лабораторной диагностике болезни Ауески животных (рекомендованы 18 мая 1978 г., б/н) 82
1.5. Инструкция по применению набора для определения антител к гликопротеину gI вируса болезни Ауески в сыворотке крови свиней методом конкурентного иммуноферментного анализа «ZETEST-Серелиза-АУЕСКИ-Ат» 88
Оспа 98
1.6. Методические указания по лабораторной диагностике оспы крупного рогатого скота, овец, коз, свиней и верблюдов (утверждены 12 ноября 1985 г., № 115-6а) . 98

Катаральная лихорадка крупного рогатого скота, овец и коз 107
1.7. Методические указания по лабораторной диагностике катаральной лихорадки крупного рогатого скота, овец и коз (утверждены 11 июня 1986 г., № 432-5) .. 107

2. **Болезни лошадей** 123
Грипп 123
2.1. Временное наставление по лабораторной диагностике гриппа лошадей (рекомендовано 15 января 1973 г., б/н) ... 123
2.2. Наставление по применению набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа лошадей (утверждено 27 февраля 2004 г., б/н) 138
Ринопневмония 140
2.3. Методические указания по лабораторной диагностике *ринопневмонии лошадей* (утверждены 27 августа 1980 г., б/н) 140
Инфекционная анемия 145
2.4. Инструкция по применению набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации (РДП) (утверждена 24 марта 2009 г.) 145

3. **Болезни крупного рогатого скота** 153
Лейкоз 153
3.1. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота (утверждены 23 июля 2000 г., № 13-7-2/2130) 153
3.2. Инструкция по применению набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота (утверждена 7 мая 2010 г. с изменениями от 21 июня 2011 г.) 168
3.3. Наставление по применению набора для выявления антител к вирусу лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) методом иммуноферментного анализа (ИФА)-Veri Test (утверждено 2 февраля 2004 г., № 13-5-02/0899) 173

3.4. Инструкция по применению тест-системы «ЛЕЙКОЗ» для выявления вируса лейкоза крупного рогатого скота (КРС) методом полимеразной цепной реакции (утверждена 19 мая 2009 г.) 180
Вирусные респираторно-кишечные инфекции 208
3.5. Методические указания по лабораторной диагностике вирусных респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота (рекомендованы 25 июля 1978 г., б/н) 208
Вирусная диарея 228
3.6. Наставление по применению набора компонентов для диагностики вирусной диареи — болезни слизистых крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа (утверждено 15 июля 1997 г., № 13-7-2/1012) 228
3.7. Инструкция по применению набор для диагностики вирусной диареи — болезни слизистых КРС методом иммуноферментного анализа «ВД-БС ИФА ВИЭВ» (утверждена 3 марта 2008 г.) 233
Инфекционный ринотрахеит 238
3.8. Методика по исследованию спермы крупного рогатого скота на контаминацию вирусом инфекционного ринотрахеита — пустулезного вульвовагинита (ИРТ-ИПВ) (утверждена 8 февраля 1983 г., б/н) 238
3.9. Инструкция по применению набора для определения антител к вирусу инфекционного ринотрахеита/ инфекционного пустулезного вульвовагинита крупного рогатого скота в сыворотке крови методом непрямого иммуноферментного анализа «ZETEST-Серелиза-ИРТ/ИПВ-Ат» 244
3.10. Инструкция по применению тест-системы для диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции (утверждена 21 мая 2009 г.) 253

Парагрипп 262
3.11. Наставления по применению набора диагностикумов парагриппа-3 КРС (утверждено 26 сентября 1996 г., № 13-7-2/748) 262
3.12. Временные методические указания по диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота методом выявления секреторных антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (утверждено 17 октября 1985 г., № 115-6а) 265
Респираторно-синцитиальная инфекция 268
3.13. Наставление по применению набора диагностикумов респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота (утверждено 26 сентября 1996 г., б/н) 268
Коронавирусный энтерит 270
3.14. Наставление по применению набора для диагностики коронавирусного энтерита крупного рогатого скота методом гемагглютинации (утверждено 11 августа 1990 г., б/н) 270

4. Болезни мелкого рогатого скота 276
Аденоматоз овец и коз 276
4.1. Временные методические указания по лабораторной диагностике аденоматоза овец и коз (утверждены 2 июля 1985 г.) 276
Висна-маеди 280
4.2. Временное наставление по применению набора диагностикумов для серологической диагностики висна-маеди овец в реакции диффузионной преципитации (утверждено 7 июля 1992 г.) 280

5. Болезни свиней 285
Классическая чума 285
5.1. Методические указания по лабораторной диагностике классической чумы свиней (утверждены 30 декабря 1996 г., № 13-4-2/809) 285

5.2. Методические указания
по лабораторной диагностике
классической чумы свиней
(утверждены 8 июня 1978 г., б/н) 297
5.3. Инструкция по применению тест-системы
для обнаружения вируса классической
чумы свиней методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР)
(утверждена 12 февраля 2009 г.) 306
Респираторный и репродуктивный синдром 314
5.4. Инструкция по применению набора
реагентов для выявления антител к вирусу
репродуктивно-респираторного синдрома
свиней иммуноферментным методом
«РРСС-СЕРОТЕСТ»
(утверждена 21 мая 2009 г.) 314
Трансмиссивный гастроэнтерит 321
5.5. Методические указания по лабораторной
диагностике вирусного (трансмиссивного)
гастроэнтерита свиней (рекомендованы
30 мая 1978 г., № 116-6а) 321
5.6. Инструкция по применению набора
реагентов для выявления антител к вирусу
трансмиссивного гастроэнтерита свиней
иммуноферментным методом
«ТГС-СЕРОТЕСТ»
(утверждена 12 августа 2010 г., б/н) 328
5.7. Инструкция по применению набора
для выявления антигенов вируса
трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС)
и ротавируса свиней (РВС) методом
иммуноферментного анализа (ИФА)
(утверждена 21 мая 2009 г.) 335
Африканская чума 342
5.8. Инструкция по применению «Тест-системы
для выявления ДНК вируса АЧС методом
ПЦР» (утверждена 25 декабря 2006 г.) ... 342
5.9. Инструкция по применению
«Набора диагностикумов для
твердофазного иммуноферментного анализа
при африканской чуме свиней»
(утверждена 3 апреля 2007 г.) 349
Парвовирусная болезнь 357
5.10. Методические указания по диагностике
парвовирусной болезни свиней
(утверждены 21 января 1989 г., б/н) 357

5.11. Наставление по применению набора для диагностики парвовирусной болезни свиней в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (утверждено 6 июня 1994 г., № 13-7-2/94) 361
Грипп ... 363
5.12. Наставление по применению набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа свиней (утверждено 7 марта 1986 г.) ... 363
Везикулярная болезнь и везикулярная экзантема ... 366
5.13. Методические указания по лабораторной диагностике везикулярной болезни и везикулярной экзантемы свиней (утверждены 15 июня 1979 г., б/н) ... 366
Энзоотический энцефаломиелит (болезнь Тешена) ... 384
5.14. Методические указания по лабораторной диагностике энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней (утверждены 1 ноября 1985 г., № 115-6а) . 384
5.15. Методические указания по лабораторной диагностике болезни Тешена (утверждены 22 марта 2002 г., № 13-5-02/0368) ... 391

6. Болезни птиц ... 399
Синдром снижения яйценоскости ... 399
6.1. Инструкция по применению «Набора для выявления антител к вирусу синдрома снижения яйценоскости-76 в реакции торможения гемагглютинации» (утверждена 29 декабря 2006 г.)
6.2. Методические указания по лабораторной диагностике синдрома снижения яйценоскости у кур (ССЯ-76) методом иммуноферментного анализа (ИФА) (утверждены 12 февраля 1990 г.) .. 406
Грипп ... 409
6.3. Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц (ВГП) иммуноферментным анализом (ИФА) (утверждена 22 июня 2008 г.) ... 409
6.4. Инструкция по применению тест-системы для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (утверждена 21 мая 2009 г.) ... 416

6.5. Инструкция по применению тест-системы для обнаружения вируса гриппа А подтипа Н5 методом ПЦР в реальном времени (утверждена 21 мая 2009 г.) 425
Энцефаломиелит 436
6.6. Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусам энцефаломиелита птиц (ЭП), инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни птиц (ИББ), ньюкаслской болезни (НБ) и реовирусу птиц (РВП) методом иммуноферментного анализа (ИФА) (утверждена 22 июня 2008 г.) 436
Оспа 443
6.7. Методические указания по лабораторной диагностике оспы птиц (утверждены 4 июня 1985 г., № 115-6а) . . 443
Болезнь Ньюкасла 447
6.8. Методические указания по определению уровня антител к вирусу ньюкаслской болезни в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (утверждены 23 июня 1997 г., № 13-7-2/988) 447
6.9. Методические указания по лабораторной диагностике болезни Ньюкасла и классической чумы птиц (гриппа птиц) (утверждены 1 февраля 1972 г.) 453
6.10. Методические указания по определению биологической активности вирусвакцин против ньюкаслской болезни птиц (утверждены 12 июля 1980 г., № 115-6) . . 468
Парамиксовирусы 475
6.11. Методические указания по выявлению парамиксовирусов, их идентификации и выявлению специфических антител (утверждены 6 февраля 1991 г., № 044-3) . 475
Инфекционная бурсальная болезнь 481
6.12. Временные методические указания по диагностике болезни Гамборо (утверждены 19 июля 1990 г., № 044-3) . . 481
6.13. Временное наставление по применению набора антигенов и сывороток для выявления специфических антител и антигенов вируса инфекционной бурсальной болезни в реакции диффузионной преципитации «Биотест-РДП» (утверждено в 2001 г.) 488

Инфекционный бронхит 492
6.14. Методические указания по лабораторной диагностике инфекционного бронхита кур (утверждены 31 июля 1980 г., № 115-6а) . 492
6.15. Наставление по лабораторной диагностике инфекционного бронхита кур (одобрено 7 мая 1973 г.) 495
Лейкоз 506
6.16. Временное наставление по лабораторной диагностике лейкоза птиц (рекомендовано 16 февраля 1975 г.) 506
Болезнь Марека (нейролимфоматоз птиц) 534
6.17. Методические указания по лабораторной диагностике болезни Марека (нейролимфоматоза) птиц (утверждены 1 марта 1979 г., № 115-6а) .. 534
Вирусный энтерит гусят 542
6.18. Методические указания по лабораторной диагностике вирусного энтерита гусят (утверждены 25 декабря 1980 г., № 115-6а) 542
Инфекционный ларинготрахеит 546
6.19. Временное наставление по лабораторной диагностике инфекционного ларинготрахеита кур (утверждено 27 августа 1964 г.) 546
6.20. Временные методические указания по определению биологической активности вирусвакцины из штамма ВНИИБТ против инфекционного ларинготрахеита птиц (утверждены 17 июля 1985 г., № 115-6а) . 553

7. **Болезни плотоядных и пушных животных** 561
Аденовирусная инфекция 561
7.1. Наставление по применению набора для выявления антигенов аденовирусов плотоядных иммуноферментным анализом (ИФА) (утверждено в 2002 г.) .. 561
Алеутская болезнь норок 567
7.2. Наставление по применению антигена и контрольной сыворотки для серологической диагностики алеутской болезни норок в реакции иммуноэлектроосмофореза (диагностикума) (утверждено 23 августа 1994 г., № 13-7-2/142) 567

7.8. Инструкция по применению набора антигена и контрольной позитивной сыворотки для серологической диагностики алеутской болезни норок из штамма «П-1» в РИЭОФ (утверждена 2 марта 2007 г.) 573
Вирусный энтерит норок 579
7.4. Методические указания по диагностике вирусного энтерита норок (утверждены 18 сентября 2000 г.) 579
Парвовирусный энтерит собак 603
7.5. Наставление по применению набора для выявления антигенов парвовирусного энтерита собак, вирусного энтерита норок и панлейкопении кошек иммуноферментным анализом (ИФА) (утверждено в 2002 г.) 603
Вирусная геморрагическая болезнь кроликов 609
7.6. Наставление по применению «Набора препаратов для лабораторной диагностики вирусной геморрагической болезни кроликов сэндвич-вариантом иммуноферментного анализа» (утверждено 10 марта 1989 г.) 609
Миксоматоз кроликов 615
7.7. Временные методические указания по лабораторной диагностике миксоматоза кроликов (утверждены 8 мая 1981 г., № 116-6а) 615
Чума плотоядных 617
7.8. Временное наставление по применению набора для выявления антигена вируса чумы плотоядных иммуноферментным анализом (ИФА) (утверждено 14 мая 1998 г., № 13-7-2/1241) 617
Коронавирусы собак и кошек 625
7.9. Инструкция по применению тест-системы «КОРОНАВИР» для выявления и идентификации коронавирусов кошек и собак методом полимеразной цепной реакции (утверждена 14 декабря 2009 г.) 625

Краткий словарь использованных ветеринарных терминов 654
Библиографический список 659
Предметный указатель 660

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Составители:
Петр Иванович БАРЫШНИКОВ,
Валентина Владимировна РАЗУМОВСКАЯ

Учебное пособие

Издание второе, исправленное

Зав. редакцией ветеринарной
и сельскохозяйственной литературы *И. О. Туренко*
Ответственный редактор *А. Г. Листова*

ЛР № 065466 от 21.10.97
Гигиенический сертификат 78.01.07.953.П.007216.04.10
от 21.04.2010 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «Лань»
lan@lanbook.ru; www.lanbook.com
192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5.
Тел./факс: (812) 412-29-35, 412-05-97, 412-92-72.
Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

Где купить

Для организаций:

Для того, чтобы заказать необходимые Вам книги, достаточно обратиться в любую из торговых компаний Издательского Дома «ЛАНЬ»:

по России и зарубежью
«ЛАНЬ-ТРЕЙД». 192029, Санкт-Петербург, ул. Крупской, 13
тел.: (812) 412-85-78, 412-14-45, 412-85-82; тел./факс: (812) 412-54-93
e-mail: gost.e-ecolog.ru : 446-869-967; www.lanpbl.spb.ru/price.htm

в Москве и в Московской области
«ЛАНЬ-ПРЕСС». 109263, Москва, 7-я ул. Текстильщиков, д. 6/19
тел.: (499) 178-65-85; e-mail: lanpress@lanbook.ru

в Краснодаре и в Краснодарском крае
«ЛАНЬ-ЮГ». 350901, Краснодар, ул. Жлобы, д. 1/1
тел.: (861) 274-10-35; e-mail: lankrd98@mail.ru

Для розничных покупателей:

интернет-магазины:
Издательство «Лань»: http://www.lanbook.com
«Сова»: http://www.symplex.ru; «Ozon.ru»; gost.e-ecolog.ru
«Библион»: http://www.biblion.ru

Подписано в печать 20.03.15.
Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108 $^{1}/_{32}$.
Усл. п. л. 35,28. Тираж 700 экз.

Заказ № 2099.

Отпечатано способом ролевой струйной печати
в АО «Первая Образцовая типография»
Филиал «Чеховский Печатный Двор»
142300, Московская область, г. Чехов, ул. Полиграфистов, д. 1
Сайт: gost.e-ecolog.ru ales@chpd.ru, тел. 8(499)270-73-59

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

ЛАНЬ®
Since 1993

Издательство «Лань»
победитель конкурса по качеству
«Сделано в Санкт-Петербурге»

ISBN 978-5-8114-1882-4

gost.e-ecolog.ru