СПРАВОЧ

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

ВИРУСНЫЕ, РИККЕТСИОЗНЫЕ И ПАРАЗИТАРНЫЕ БОЛЕЗНИ

gost.e-ecolog.ru

СПРАВОЧНИК

•

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

•

ВИРУСНЫЕ, РИККЕТСИОЗНЫЕ И ПАРАЗИТАРНЫЕ БОЛЕЗНИ

Под редакцией Б. И. АНТОНОВА

МОСКВА АГРОПРОМИЗДАТ 1987

ББК 48.73
Л12
УДК 619:616.98/.99(031)

Составители: *Б. И. Антонов, В. В. Борисова, Л. П. Каменева, Л. И. Ковалерчук, Г. А. Михальский, В. Д. Певнева, Л. И. Прянишникова.*

Лабораторные исследования в ветеринарии: Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни: Справочник/Под ред. Б. И. Антонова. — М.: Агропромиздат, 1987. — 240 с.: ил.

Л12

В книге даны методы лабораторного исследования патологического материала с целью определения возбудителей вирусных, риккетсиозных и паразитарных болезней животных. Они изложены по единой схеме. Методы унифицированы и стандартизированы.

Для ветврачей и фельдшеров, лаборантов ветеринарных лабораторий.

Л $\frac{3805020000-166}{035(01)-87}$ 332—87 ББК 48.73

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ:
ВИРУСНЫЕ, РИККЕТСИОЗНЫЕ И ПАРАЗИТАРНЫЕ БОЛЕЗНИ

Справочник

Составители: **Борис Иванович Антонов, Валерия Валентиновна Борисова, Людмила Петровна Каменева и др.**

Зав. редакцией *В. Г. Федотов.* Редактор *В. Н. Сайганиди.* Художественный редактор *Н. А. Никонова.* Технический редактор *Н. А. Зубкова.* Корректор *Н. В. Карпова*

ИБ № 5093

Сдано в набор 02.10.86. Подписано к печати 22.01.87. Т-00912. Формат 84×108$^{1}/_{32}$. Бумага тип. № 2. Гарнитура Литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 12,6. Усл. кр.-отт. 12,6. Уч.-изд. л. 18,25. Изд. № 226. Тираж 33 000 экз. Заказ № 668. Цена 1 р. 10 к.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО «Агропромиздат», 107807, ГСП, Москва, Б-53, ул. Садовая-Спасская, 18

Владимирская типография Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли 600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7

© ВО «Агропромиздат», 1987

ПРЕДИСЛОВИЕ

Успешное выполнение намеченной XXVII съездом КПСС широкой программы развития в нашей стране агропромышленного комплекса в немалой степени зависит от хорошей организации ветеринарного обслуживания животноводства, четко налаженной работы ветеринарных диагностических лабораторий. Проводимые в лабораториях исследования позволяют правильно организовать мероприятия по предупреждению инфекционных и инвазионных болезней, а в случаях возникновения заболевания своевременно поставить диагноз и принять целенаправленные меры по его быстрейшей ликвидации.

В работе ветеринарных лабораторий все большее применение находят современные методы исследований, одновременно идет совершенствование диагностики многих заболеваний, предлагаются новые более чувствительные и достоверные методы, позволяющие полнее и на ранних стадиях выявлять заболевших животных и тем самым способствовать быстрейшему оздоровлению хозяйств.

Специалисты лабораторий постоянно расширяют перечень показателей и болезней, на которые проводятся исследования.

За последнее время утверждено значительное количество инструктивных документов по проведению лабораторных исследований, что позволило более четко организовать работу специалистов, улучшить качество исследований, получать сопоставимые результаты.

Оснащение лабораторий современным оборудованием позволяет внедрять в работу более точные инструментальные методы.

В своей работе ветеринарные лаборатории не могут использовать всего многообразия предлагаемых методов исследования из-за того, что они или недостаточно апробированы, или из-за сложности используемого оборудования. Имеют место случаи, когда предлагаемые различными авторами методы при определении одних и тех же показателей дают несовпадающие результаты. Поэтому в настоящий справочник включены методы лабораторных исследований патологического материала, полученного от больных, убитых или павших сельскохозяйственных животных, апробированные Центральной ветеринарной лабораторией и утвержденные в разные годы бывшим Министерством сельского хозяйства СССР.

Книга содержит методические указания по диагностике вирусных, риккетсиозных, хламидиозных болезней, а также методические указания по лабораторной диагностике паразитарных болезней животных и пчел.

Методики излагаются по единой схеме: взятие и пересылка патологического материала, методы его обработки, микроскопические исследования, включая световую и люминесцентную микроскопию, выделение возбудителей на куриных эмбрионах и культурах клеток, заражение лабораторных животных, гистологические исследования, идентификация и дифференциация возбудителей с использованием различных методов, определение биологической активности вакцин и исследования на напряженность иммунитета.

Методы лабораторных исследований, представленные в справочнике, унифицированы и стандартизированы, что создает возможность для стандартизации аппаратов, приборов, инструментов, посуды, реактивов, биопрепаратов и другого специального имущества, определения объема подготовки специалистов и степень оснащения ветеринарных диагностических лабораторий. Таким образом, стандартизация методов исследования является способом наведения строгого порядка в ветеринарной лабораторной работе.

ЛЕЙКОЗ ПТИЦ

Временное наставление по лабораторной диагностике лейкоза птиц

(Рекомендовано 16 февраля 1975 г.)

1. Лабораторная диагностика лейкоза птиц основана на выявлении группоспецифического (ГС) антигена вирусов лейкоз-саркомной группы в серологических реакциях: реакции связывания комплемента (РСК), кофал-тесте, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммунофлуоресценции (ИФ).

В случае необходимости выявления типоспецифических (ТС) антигенов РИФ-тестом, типоспецифических (ТС) антител реакцией нейтрализации и выделения вирусов лейкоз-саркомной группы материалы направляют в соответствующие научно-исследовательские институты.

2. Лабораторная диагностика лейкоза птиц применяется для изучения эпизоотического состояния птицы по лейкозу и оздоровления птицеводческих хозяйств от этой болезни в комплексе с общими

ветеринарно-санитарными мероприятиями, для выведения линий кур, генетически устойчивых к лейкозу, а также для контроля эмбрионов, используемых биопромышленностью.

3. Методика постановки РСК при лейкозе птиц.

3.1. РСК применяется для индикации в исследуемом материале (сыворотках крови, культурах фибробластов и аллантоисной жидкости эмбрионов, экстрактах органов кур) ГС-антигена вирусов лейкоз-саркомной группы.

3.2. Реакция ставится микрометодом с использованием микротитратора Такачи в объеме 0,125 мл всех компонентов. Реакцию можно ставить и макрометодом в объеме 0,5 мл. Первую фазу реакции — связывание — проводят при температуре 4 °С в холодильнике в течение 16—18 ч. Вторую фазу — индикаторную — во влажной камере термостата при температуре 37—38 °С в течение 1 ч.

3.3. Компоненты реакции: фосфатно-буферный или физиологический раствор с pH 7,2; гемолитическая сыворотка биофабричного производства (гемолизин) с рабочим титром не менее 1 : 1200; свежая или консервированная сыворотка морской свинки (комплемент); 3 %-ная взвесь эритроцитов барана; специфическая сыворотка, полученная на вирус саркомы Рауса штаммов Бриан стандартный или Шмидта — Руппина методом иммунизации голубей или хомяков; унифицированный диагностикум, полученный на вирус эритробластоза штамма Р путем иммунизации кроликов; нормальная (контрольная) сыворотка здорового голубя, хомяка или кролика; специфический (положительный) антиген — осветленный центрифугат 10 %-ного экстракта опухолевой ткани саркомы Рауса или 10 %-ный экстракт культуры клеток фибробластов, зараженных вирусом саркомы Рауса; отрицательный (контрольный) антиген — осветленный центрифугат 10 %-ного экстракта мышц и органов от здоровых кур или культуры фибробластов из эмбриона курицы, свободной от контаминации вирусами лейкоз-саркомной группы; исследуемый материал — сыворотки крови кур, 10—20 %-ные экстракты пораженных органов кур, культуры фибробластов эмбрионов кур 3-го пассажа и т. д. в разведениях 1 : 2—1 : 4. После разведения для освобождения ГС-антигена вирусов лейкоз-саркомной группы и ликвидации антикомплементарных свойств материал подвергают 3—5-кратному замораживанию и размораживанию, инактивированию при температуре 56 °С в течение 30 мин в водяной бане и центрифугированию при 3 тыс. об/мин в течение 20 мин.

3.4. Титрование компонентов реакции. Предварительно титруют гемолизин, комплемент и специфическую сыворотку или унифицированный диагностикум.

Титрование гемолизина и комплемента в гемолитической системе проводят по квадратной схеме. Во вспомогательных рядах пробирок готовят раздельно разведения гемолизина от 1 : 1000 до 1 : 4000 и комплемента от 1 : 10 до 1 : 80 по общепринятым методикам. Затем соответственно соединяют их в лунках пластины, разливая каждое разведение гемолизина по вертикальным рядам, а разведения комплемента по горизонтальным с помощью капельницы по 0,025 мл. Добавляют по 0,025 мл 3 %-ной взвеси бараньих эритроцитов и по 0,05 мл буферного или физиологического раствора во все лунки пластины.

Контроли: гемолизина (гемолизин 1 : 100+эритроциты по 0,025 мл+буферный или физиологический раствор до объема

0,125 мл); комплемента (комплемент 1 : 10+эритроциты по 0,025 мл+ +буферный или физиологический раствор до объема 0,125 мл); эритроцитов (эритроциты 0,025 мл+буферный или физиологический раствор до объема 0,125 мл).

После разлива всех компонентов пластины встряхивают и ставят во влажную камеру термостата при температуре 37—38 °С на 1 ч. Затем определяют титр гемолизина и комплемента при отсутствии гемолиза эритроцитов во всех контрольных луночках. Титром гемолизина считают то его наибольшее разведение, при котором наступает полный гемолиз эритроцитов в присутствии комплемента, разведенного 1 : 10.

Гемолитическая система для опыта готовится по общепринятой методике с использованием гемолизина в 3-кратном титре.

Титр комплемента — его наивысшее разведение, при котором произошел полный гемолиз эритроцитов при соответствующем максимальном разведении гемолизина. За рабочее разведение комплемента принимают разведение через ряд выше титра комплемента.

Определение одной гемолитической единицы комплемента проводят перед каждым опытом. С этой целью испытывают дробные дозы комплемента в пределах рабочего разведения от 0,005 до 0,022. Ввиду невозможности отмерить столь малые объемы готовят во вспомогательном ряду пробирок 50-кратные дозы комплемента.

Пример. Если рабочее разведение комплемента равно 1 : 20, то во вспомогательном ряду пробирок готовят из этого разведения следующие дробные дозы комплемента (табл. 1).

1. Разведение комплемента

Компоненты, мл	Номер пробирок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Комплемент 1 : 20	0,25	0,35	0,5	0,6	0,75	0,85	1,0	1,1
Буферный или физраствор	1,0	0,9	0,75	0,65	0,5	0,4	0,25	0,15
Искомая доза комплемента	0,005	0,007	0,01	0,012	0,015	0,017	0,02	0,022

Отдельной капельницей из каждой пробирки вспомогательного ряда комплемента по 0,025 мл переносят в ряды лунок пластины, соответствующие: исследуемым антигенам или сывороткам, взятым выборочно от партии; контрольным положительному и отрицательному антигенам; специфической сыворотке или унифицированному диагностикуму, которые предварительно разливают в разведении 1 : 2 или 1 : 4 по 0,025 мл.

Во все лунки вносят буферный или физиологический раствор по 0,025 мл, а в лунки контроля на гемотоксичность — по 0,05 мл. Пластины встряхивают и выдерживают при температуре 4 °С в холодильнике в течение 16—18 ч. После этого в лунки добавляют гемолитическую систему в объеме 0,05 мл. Пластины встряхивают и помещают во влажную камеру термостата при температуре 37—38 °С на 1 ч. Через 15 мин пластины повторно встряхивают. Реакцию учитывают после 2—3-часовой выдержки смеси компонентов при комнатной температуре.

Контроли: испытуемые и контрольные антигены и сыворотки на гемотоксичность (антигены и сыворотки по 0,025 мл+гемсистема 0,05 мл+буферный или физиологический раствор до объема 0,125 мл); комплемента (отдельно каждая доза комплемента 0,025 мл+гемсистема 0,05 мл+буферный или физиологический раствор до объема 0,125 мл); гемсистемы (гемсистема 0,05 мл+буферный или физиологический раствор до объема 0,125 мл).

Одной гемолитической единицей комплемента считают минимальное его количество, необходимое для полного гемолиза взвеси эритроцитов в рядах лунок с основными разведениями испытуемых и контрольных антигенов и сывороток (табл. 2).

2. Результаты титрования комплемента в присутствии испытуемых и контрольных антигенов и сывороток

Компоненты	Доза комплемента, мл							
	0,005	0,007	0,01	0,012	0,015	0,017	0,02	0,022
Исследуемый антиген или сыворотка	++	++	++	++	++	+	0	0
	++	++	++	++				
Специфический антиген	++	++	++	++	++	++	0	0
	++	++	++	++	++			
Отрицательный антиген	++	+	±	0	0	0	0	0
Специфическая сыворотка к ВСР или унифицированный диагностикум	++	++	++	++	++	0	0	0
	++	++	++	++				

В данном примере активность комплемента соответствует дозе 0,02 мл в присутствии антигенов, а в присутствии сыворотки — 0,017 мл.

За гемолитическую единицу комплемента принимается доза 0,02 мл. Для основного опыта берут 2—3 восходящих дозы или 1,5—2 ед.

Пример расчета комплемента для опыта на 2 ед.: в опыте необходимо заполнить 200 лунок. Чистого комплемента для опыта потребуется:

$$\frac{0{,}02 \cdot 2 \cdot 200}{20} = 0{,}4.$$

Общий объем разведенного комплемента для опыта равен: $0{,}025 \cdot 200 = 5$ мл. Следует брать 0,4 мл чистого комплемента на 4,6 мл буферного или физиологического раствора. Аналогично проводят расчет и 1,5-кратной дозы комплемента.

Титрование специфической сыворотки к ВСР или унифицированного диагностикума. Титрование проводят в качестве контроля для полученной серии диагностикума. Сыворотку титруют по квадратной схеме с положительным и отрицательным антигенами. Готовят разведения сыворотки и положительного антигена от 1 : 2 до 1 : 128, которые вносят в лунки пластины по вертикальным и горизонтальным рядам. Отрицательный антиген используют в разведении 1 : 2 или 1 : 4. Затем в лунки добавляют комплемент, концентрация которого должна соответствовать 50 % избытку, т. е. составлять 1,5 ед. Пластины с компонентами тщательно встряхивают и выдерживают 16—18 ч при температуре 3—4 °С.

Для контроля разливают нормальную сыворотку в разведениях 1 : 4 и 1 : 8 для каждого разведения положительного и отрицательного антигенов. Добавляют гемолитическую систему, выдерживают 45 мин при температуре 37 °С, после чего учитывают результаты реакции (табл. 3).

3. Примерная схема учета результатов

Разведение антигена	Разведение специфической сыворотки							Контроли нормальной сыворотки	
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:4	1:8
Положительного									
1 : 2	++++	++++	++++	++++	++	+	0	0	0
1 : 4	++++	++++	++++	++++	++	+	0	0	0
1 : 8	++++	++++	++++	++	+	0	0	0	0
1 : 16	++++	++++	++	+	0	0	0	0	0
1 : 32	++++	++++	+	0	0	0	0	0	0
1 : 64	++++	+	0	0	0	0	0	0	0
1:128		0	0	0	0	0	0	0	0
Отрицательного									
1 : 2		+	0	0	0	0	0	0	0
1 : 4		0	0	0	0	0	0	0	0

Титром специфической сыворотки считают то наибольшее разведение ее, которое вызывает задержку гемолиза на 3 и 4 плюса при максимальном разведении положительного антигена. Титр специфической сыворотки должен быть не ниже 1 : 8.

3.5. Постановка основного опыта. Схема постановки основного опыта представлена в таблице 4. В ряды из 7 лунок по горизонтали вносят исследуемые и контрольные антигены в разведении, установленном при титровании комплемента в присутствии испытуемых антигенов. Затем по вертикали вносят: буферный или физиологический раствор (в 1-й и 2-й ряды по 0,025 мл — контроль на антикомплементарность; в 7-й ряд по 0,05 мл — контроль на гемотоксичность); специфическую сыворотку в ее титре (в ряды 3-й и 4-й); отрицательную сыворотку в разведении, равном разведению специфической сыворотки (контроль специфичности антираусовской сыворотки в 5-й и 6-й ряды). Затем во все нечетные ряды, кроме 7, вносят комплемент в 1,5-кратной дозе, в четные — в 2-кратной дозе. Дополнительно контролируют комплемент в 1,5- и 2-кратной дозе и гемолитическую систему. Пластины встряхивают и ставят на 16—18 ч при температуре 4 °С в холодильник, затем добавляют во все лунки гемолитическую систему. Пластины встряхивают и ставят во влажную камеру термостата при температуре 37 °С на 1 ч. Через

4. Схема постановки основного опыта

Компоненты, мл	Ряды лунок пластин							Контроли сывороток на гемотоксичность и антикомплементарность в рядах лунок						Контроль комплемента	
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	1	2	3	1,5 дозы	2,0 дозы
Исследуемый антиген в разведении 1 : 2	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025								
Специфическая сыворотка хомяка, голубя или унифицированный диагностикум в рабочем титре	—	—	0,025	0,025	—	—	—	0,025	0,025	0,025	—	—	—		
Сыворотка здорового голубя, хомяка или кролика	—	—	—	—	0,025	0,025	—	—	—	—	0,025	0,025	0,025		
Физиологический раствор	0,025	0,025	—	—	—	—	0,05	0,025	0,025	0,05	0,025	0,025	0,05	0,05	0,05
Комплемент 1,5 дозы	0,025	—	0,025	—	0,025	—	—	0,025	—	—	0,025	—	—	0,025	
Комплемент 2 дозы	—	0,025	—	0,025	—	0,025	—	—	0,025	—	—	0,025	—		
Температурный режим 4—6 °С в течение 16—18 ч															
Гемолитическая система	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Температурный режим 37 °С в течение 45 мин															

Примечание. 3—4-й ряд — индикация группоспецифического антигена; 1—2-й — контроль на антикомплементарность; 5—6-й — контроль специфичности антираусовской сыворотки; 7-ой — контроль на гемотоксичность; остальные контроли ставят в лунках ниже основного опыта.

каждые 15 мин пластины встряхивают во избежание преждевременного оседания эритроцитов. Окончательный учет результатов производят после 2-часовой выдержки пластин при комнатной температуре по осадку негемолизированных эритроцитов по четырехплюсовой системе: (++++) и (+++) — положительный результат, (++) — сомнительный, (+) и (—) — отрицательный.

Результаты считаются достоверными при условии: а) отсутствия антикомплементарных и гемотоксических свойств у исследуемых и контрольных антигенов и сывороток; б) наличия задержки гемолиза в реакции сыворотки к ВСР или унифицированного диагностикума с положительными контрольными антигенами и наличия полного гемолиза в реакциях с отрицательными антигенами; в) наличия полного гемолиза контрольной отрицательной сыворотки с положительным и отрицательным антигенами.

4. Методика постановки кофал-теста.

4.1. Кофал-тест ставится в тех случаях, когда в исследуемом материале вирус лейкоз-саркомной группы находится в невысоких титрах и не улавливается методом РСК.

4.2. Для постановки кофал-теста необходимо вначале произвести накопление вирусов путем пассирования исследуемого материала в

5. Протокол основного опыта

Номера и названия исследуемых антигенов и контролей	Разведение антигенов	Доза комплемента					
		контроль антигенов	1,5 единицы		Контроль антигенов	2 единицы	
			ССГ, ССХ или УД	СЗГ, СЗХ или СЗК		ССГ, ССХ или УД	СЗГ, СЗХ или СЗК
Исследуемый антиген	1:2	0	++ ++	0	0	++ ++	0
	1:4	0	++ ++	0	0	++ ++	0
Контроли:							
положительный антиген		0	++ ++	0	0	++ ++	0
отрицательный антиген		0	0	0	0	0	0
Контроль сывороток на антикомплементарные свойства		—	0	0	—	0	0
Контроль сывороток на гемотоксичность		—	++ ++	++ ++	—	++ ++	++ ++

Обозначения: ССГ — специфическая сыворотка голубя; ССХ — специфическая сыворотка хомяка; УД — унифицированный диагностикум; СЗГ — сыворотка здорового голубя; СЗХ — сыворотка здорового хомяка; СЗК — сыворотка здорового кролика.

* Фенотип особи представляет частный случай проявления генотипа в конкретных условиях среды. Фенотип устанавливают на основании данных РИФ-теста. Фибробласты эмбрионов кур РИФ-отрицательные (не содержащие вирусов лейкоз-саркомы подгрупп A, B, C, D) и чувствительные к заражению этими вирусами обозначают С/О.

культуре клеток фибробластов эмбрионов кур (ФЭК), желательно фенотипа С/О*, свободных от контаминации вирусами лейкоз-саркомной группы. Зараженные культуры клеток ФЭК трехкратно субкультивируют в термостате в течение 4 дн. каждую субкультуру. Из клеток третьей генерации готовят антиген, который исследуют в РСК (табл. 5).

Для накопления вируса и приготовления культурального антигена исследуемым материалом (экстракты внутренних органов, аллантоисная жидкость, сыворотка крови и т. д.) инокулируют по 2 матраца первичной культуры ФЭК.

2 матраца с культурой клеток той же партии заражают штаммом RSV (RAV-1) вируса саркомы Рауса (положительный контроль), 2 матраца с культурой ФЭК оставляют незараженными (отрицательный контроль). Культуры ФЭК поддерживают в виде монослойной культуры клеток 12—14 дн. методом 3-кратного субкультивирования. В день окончания культивирования из матрацев сливают культуральную жидкость и добавляют в каждый матрац по 4—5 мл физиологического раствора (pH 7,2). Клетки разрушают 3—5-кратным замораживанием и оттаиванием. Содержимое трех групп матрацев сливают в 3 флакона и центрифугируют при 4 тыс. об/мин 30 мин. Полученные культуральные антигены (надосадочные жидкости) сохраняют при —20 °С до проверки в РСК.

4.3. Кофал-тест ставится в объеме 0,125 мл микрометодом по Такачи с использованием 1,5—2,0 гемолитических ед. комплемента, 3 ед. гемолизина, 4 ед. специфической сыворотки и 2 ед. антигена.

5. Реакция непрямой гемагглютинации.

5.1. Компоненты реакции: препарат для диагностики лейкоза птиц (ПДЛП); исследуемые сыворотки, которые хранят в холодильнике при 4 °С не более 7 дн.; физиологический раствор.

5.2. Реакцию ставят капельным методом на предметном стекле при температуре не ниже 18—20 °С. На чистое, обезжиренное предметное стекло наносят каплю испытуемой сыворотки и добавляют каплю растворенного в дистиллированной воде ПДЛП. Пипетку после каждой сыворотки промывают физиологическим раствором не менее 5—6 раз. Предметное стекло легко покачивают и не позднее 2 мин производят учет реакции макроскопически на белом фоне. Реакцию оценивают по четырехплюсовой системе: (++++) и (+++) — положительная реакция, эритроциты все или почти все агглютинированы; (++) — сомнительная реакция, имеется взвесь неагглютинированных эритроцитов; (+) и (—) — отрицательная реакция, большинство или все эритроциты не агглютинированы. Результаты учитываются при отрицательном контроле ПДЛП с физиологическим раствором.

6. Метод иммунофлуоресценции.

6.1. Для иммунофлуоресцентного исследования необходимо иметь люминесцентный микроскоп МЛ-2А, МЛ-2Б или другой; объектив 90, окуляры 4 или 5, светофильтры СЗС-7 или СЗС-14, ФС-1, БС-8, ЖС-18, ЖС-19 и другие в соответствии с наставлением по использованию люминесцентного микроскопа.

6.2. Для лабораторной диагностики ГС-антигена вирусов лейкоз-саркомной группы используют прямой вариант метода флуоресцирующих антител. Сущность этого метода заключается в соединении меченых ФИТЦ антител с ГС-антигенов вирусов лейкоз-саркомной группы.

6.3. Методом иммунофлуоресценции исследуют мазки крови кур, мазки-отпечатки из патологического материала и культур клеток фибробластов эмбрионов кур. В качестве контроля берут мазки крови или мазки-отпечатки от здоровых кур-доноров или культуру ФЭК, свободную от контаминации вирусами лейкоза-саркомы. Для проведения исследования используют люминесцирующую сыворотку к ГС-антигену вирусов лейкоза-саркомы; контрольную меченую сыворотку от интактных кроликов или голубей; фосфатно-буферный раствор с pH 7,4, который разводится физиологическим раствором 1 : 50; ацетон безводный для фиксации мазков; глицерин с фосфатным буфером, pH 8,0 (9 частей глицерина нейтрального и 1 часть фосфатного буфера); нефлуоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель.

6.4. Приготовление исследуемого материала. Каплю крови из подкрыльцовой вены наносят на предметное стекло и, сделав тонкий мазок, высушивают его при комнатной температуре. Для приготовления мазков-отпечатков в стерильную чашку Петри наливают 0,5 мл инактивированной сыворотки крови кур-доноров, разведенной 1 : 1 дистиллированной водой. Исследуемую ткань или органы измельчают и вносят в сыворотку, суспендируют до помутнения сыворотки. Из полученной суспензии готовят мазки на предметных стеклах, которые подсушивают на воздухе. Для приготовления ФЭК, свободных от контаминации вирусами лейкоза-саркомы, культуру клеток последних выращивают на покровных стеклах в пробирках (см. п. 7.4).

Исследуемым материалом в дозе 0,2 мл заражают ФЭК (не менее 8 пробирок на одну исследуемую пробу) с хорошим монослоем. В каждую пробирку вносят 1,8 мл поддерживающей среды с антибиотиками. После 4—5-суточного инкубирования зараженных ФЭК при 37,6 °С покровные стекла извлекают из пробирок и не менее 3 раз отмывают фосфатно-буферным раствором (pH 7,4), а затем подсушивают на воздухе.

6.5. Контрольные препараты: мазки от здоровых кур-доноров или культура ФЭК из эмбрионов, неконтаминированных вирусами лейкоз-саркомной группы+специфическая к ГС-антигену меченая сыворотка кролика; исследуемые мазки или культура ФЭК+ +контрольная меченая сыворотка интактного кролика. Результат отрицательный.

6.6. Интенсивность свечения приготовленных препаратов оценивают по 4-плюсовой системе. Положительным результатом считается зеленоватая люминесценция морфологически типичных клеток с более интенсивным свечением их по периферии на (++++) и (+++), сомнительным на (++) и отрицательным на (+) и (—).

Примечание. При использовании люминесцирующей сыворотки, приготовленной к ГС-антигену на голубях, ставят следующие контроли: а) культура ФЭК, свободная от контаминации вирусами лейкоза-саркомы+специфическая к ГС-антигену меченая сыворотка голубя; б) исследуемая культура ФЭК+ +контрольная меченая сыворотка интактного голубя.

7. РИФ-тест.

7.1. РИФ-тест основан на интерференции между вирусом лейкоза птиц и вирусом саркомы Рауса в культуре ФЭК. Тест использу-

ют для выделения и изучения вирусов лейкоза. С помощью РИФ-теста исследуют на содержание лейкозных вирусов куриные эмбрионы, сыворотку крови и надосадочную жидкость из гомогенатов органов птицы, подозреваемой в заболевании лейкозом. Из куриных эмбрионов, исследуемых на наличие вируса лейкоза, готовят ФЭК. Другой исследуемый материал (сыворотку крови, надосадочную жидкость) вносят в культуру ФЭК, приготовленную из эмбрионов от «безлейкозных» несушек. В качестве контроля используют культуры ФЭК, приготовленные из эмбрионов от «безлейкозных» несушек. Реакция является строго типоспецифичной.

7.2. Компоненты реакции: эмбрионы «безлейкозных» кур 10—12-дневные; исследуемый материал — индивидуальные эмбрионы, сыворотка или плазма крови, аллантоисная жидкость, надосадочная жидкость из 20 % гомогенатов внутренних органов; вирус саркомы Рауса (ВСР) подгрупп А, В, С, D; набор питательных сред:

а) среда роста для получения первичных ФЭК, %: 0,5 %-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хэнкса — 90; сыворотка теленка — 10;

б) поддерживающая среда, %: среда Игла — 47,5; среда 199 — 47,5; сыворотка теленка — 5;

в) поддерживающая среда для субкультур первого пересева, %: среда Игла — 60; среда 199 — 30; триптозо-фосфатный бульон «Дифко» — 5; сыворотка теленка — 5;

г) поддерживающая среда для субкультур второго пересева, %: среда Игла — 90; триптозо-фосфатный бульон «Дифко» — 5; сыворотка теленка — 5.

Для приготовления рабочего раствора триптозно-фосфатного бульона берут 29,5 г порошка этого препарата, растворяют в 1 л бидистиллированной воды и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин.

Антибиотики добавляют во все среды из расчета 100 ЕД/мл; pH всех сред не должна превышать 7,2—7,4. Для подавления грибковой микрофлоры в поддерживающую и питательную среды добавляют нистатин или натриевую соль нистатина. Данный антибиотик используют в виде спиртового или водного раствора в дозе 30—40 ЕД/мл.

7.3. Бактериологическому контролю подвергают все растворы, питательные среды, клеточную взвесь, сыворотку крови теленка.

7.4. Первичные культуры ФЭК готовят из 10—12-дневных куриных эмбрионов по общепринятой методике. Для отделения клеток ФЭК ткань промывают средой «а», пипетируют 2—3 мин, фильтруют через 4 слоя марли, к остатку добавляют новую порцию питательной среды и так повторяют 3 раза. Выращенную культуру ФЭК из «безлейкозных» и исследуемых эмбрионов используют для определения наличия вируса в исследуемом материале (схема 1) и для установления факта контаминации исследуемых эмбрионов кур (схема 2). В первом случае проводят заражение ФЭК фенотипа С/О, свободных от контаминации вирусами лейкоз-саркомной группы, исследуемым материалом из расчета 3—5 мл на матрац. В контрольных матрацах производят только замену среды роста на поддерживающую среду. Во втором случае производят замену среды роста на поддерживающую как в исследуемой, так и в контрольной культурах.

Схема 1

Выделение и изучение вирусов лейкоза в исследуемом материале (сыворотка крови, пораженные органы и т. д.)

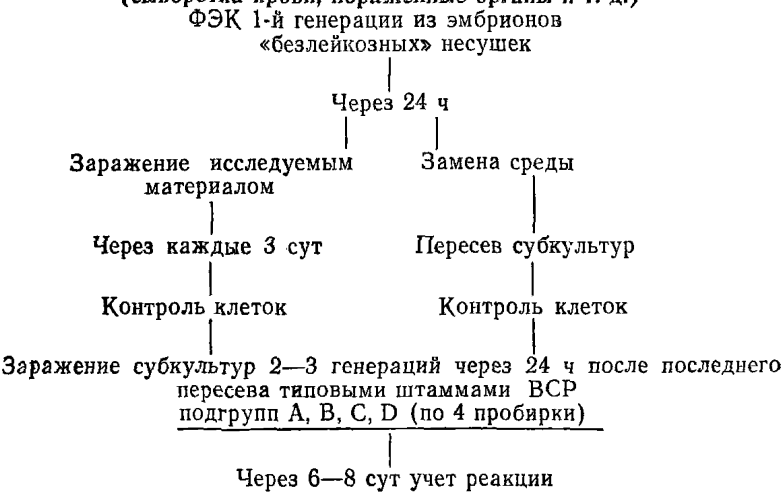
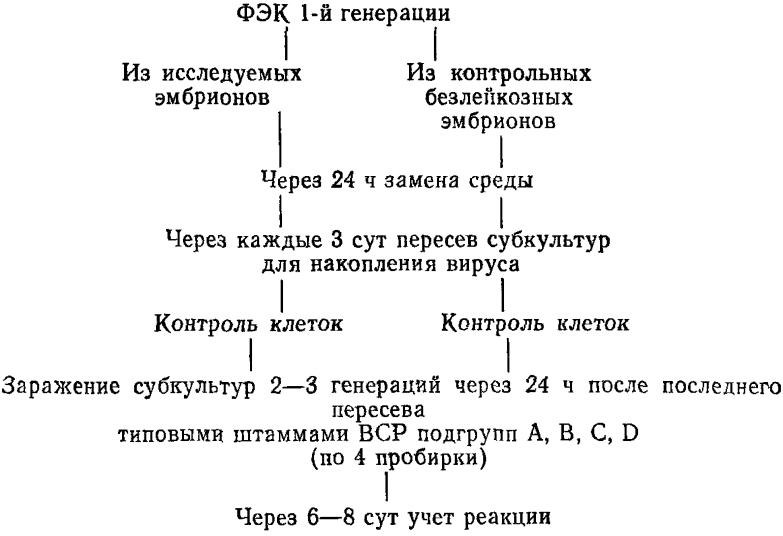


Схема 2

Исследование эмбрионов от индивидуальных несушек на наличие контаминации их вирусами лейкоз-саркомной группы



7.5. Для получения субкультуры второго пересева на 4—5-е сутки роста первичной культуры проводят ее первый пересев. Из матрацев со сплошным монослоем жизнеспособных клеток первичной культуры ФЭК сливают и отсасывают питательную среду, наливают 0,25 %-ный раствор трипсина и оставляют на 1—3 мин при комнатной температуре. Затем трипсин сливают, монослой промывают раствором Хэнкса с сывороткой теленка и антибиотиками, сливают его и вносят среду «в». Тщательно смывают клетки со стенок матрацев, объединяют однотипные взвеси из разных матрацев в один флакон и пипетируют. Полученную гомогенную взвесь после подсчета числа клеток разводят средой «в» до посевной дозы (200—300 тыс. в 1 мл), разливают в стерильные матрацы и ставят в термостат при 36,6 °С. Через 3 сут делают второй пересев субкультур (третья генерация), используя среду «г». Культуру разливают в стерильные пробирки или пенициллиновые флаконы по 1 мл.

7.6. Заражение субкультур второго пересева проводят через 24 ч. Заражают соответствующими штаммами ВСР подгрупп A, B, C, D в дозе 0,2 мл в разведениях от 10^{-2} до 10^{-5}, что устанавливают путем предварительной титрации вируса. На каждое разведение одного штамма берут не менее 4 пробирок. Для разведения ВСР используют среду «г».

7.7. Учет результатов постановки РИФ-теста. Подсчет фокусов трансформации проводят на 8-й день после заражения субкультур второго пересева. В случае наличия в исследуемых эмбрионах вирусов лейкоза, суперинфицирование ВСР клеток ФЭК, приготовленных из эмбрионов, не ведет к образованию очагов трансформации. То же самое наблюдают при наличии вируса в исследуемом материале (плазме и сыворотке крови, надосадочной жидкости), которым заражали ФЭК первой генерации (результат РИФ-теста положителен).

В контрольных и исследуемых культурах, не содержащих вирусов лейкоза, после заражения их ВСР образуются очаги трансформации (РИФ-тест отрицателен) — своеобразные морфологические изменения, устанавливаемые микроскопически. Это белые пятна, состоящие из скопления круглых, возвышающихся, монослойно растущих трансформированных клеток. Количество образовавшихся фокусов указывает на степень чувствительности ФЭК к заражению ВСР. О степени чувствительности ФЭК к зараженню ВСР судят по относительной чувствительности культур ФЭК. Относительная чувствительность культур ФЭК к ВСР определяется частным от деления среднего количества очагов трансформации в каждой пробирке индивидуальной культуры на среднее количество очагов трансформации контрольной или наиболее чувствительной культуры данного опыта.

Для исключения факта генетической резистентности культур ФЭК исследуют надосадочную жидкость из резистентных культур в кофал-тесте на наличие в ней ГС-антигена вирусов лейкоза-саркомы. При отсутствии ГС-антигена культура ФЭК и соответственно эмбрионы и курица относятся к генетически устойчивым к заражению вирусами лейкоза-саркомы определенной серологической подгруппы.

8. Реакция нейтрализации (РН).

8.1. Основана на выявлении нейтрализации ВСР определенной серологической подгруппы специфическими антителами исследуемой сыворотки крови кур. Реакцию применяют для обнаружения специ-

фических антител в сыворотках крови кур, определения активности гипериммунных сывороток к вирусам лейкоза-саркомы и идентификации указанных вирусов со специфическими типовыми сыворотками.

8.2. Реакцию нейтрализации можно ставить на разных моделях: в культуре ФЭК, на ХАО куриных эмбрионов или на цыплятах. В зависимости от метода постановки реакции необходимы: первичная культура ФЭК, 11-дневные эмбрионы кур или цыплят 2-недельного возраста; исследуемые сыворотки крови, инактивированные при температуре 56 °С в течение 30 мин; типовые гипериммунные сыворотки (ТС) к ВСР 4 серологических подгрупп (А, В, С, D); типовые штаммы ВСР 4 серологических подгрупп:

ВН — RSV (RAV-1) — серологическая подгруппа А;
ВН — RSV (RAV-2) — серологическая подгруппа В;
ВН — RSV (RAV-49) — серологическая подгруппа С;
ВН — RSV (RAV-50) — серологическая подгруппа D.

8.3. Для поддержания типовых штаммов ВСР в состоянии высокой онкогенной активности последний пассируют на 10-дневных цыплятах. Вируссодержащим материалом для заражения цыплят служит 30 %-ная суспензия опухолевой массы в среде 199 или физиологическом растворе с добавлением гиалуронидазы 100 ЕД/мл и антибиотиков, освобожденная от клеток центрифугированием при 3 об/мин в течение 30—40 мин. Вируссодержащую суспензию вводят в перепонку крыла в дозе 0,2 мл. Через 8—10 дн. после заражения развивается опухоль, которую вылущивают с соблюдением стерильности. Вируссодержащую опухолевую массу разрезают на небольшие кусочки и хранят при температуре минус 20 °С в герметично закрывающихся инсулиновых флаконах или капсулах, применяемых для сохранения спермы.

8.4. Перед использованием штаммы ВСР титруют на цыплятах или эмбрионах. В первом случае используют 10—12-дневных цыплят, которым вводят 10-кратные разведения ВСР в 4 точки крыловых перепонок по 0,1 мл на каждую точку (рис. 1).

Через 8—10 дн. после заражения осматривают у цыплят места инъекции с целью контроля появления опухоли. Подсчет титра вируса проводят по методу Рида и Менча и выражают в $ОД_{50}$/мл (50 %-ная онкогенная доза). В РН используют штаммы ВСР с онкогенной активностью не ниже $10^{-4,5}ОД_{50}$ в 1 мл.

8.5. При титровании штаммов ВСР на 11-дневных куриных эмбрионах 10-кратные разведения ВСР инокулируют в дозе 0,1 мл на ХАО. Каждым разведением заражают по 10 эмбрионов. Зараженные эмбрионы без изменения их положения помещают в термостат и инкубируют до 18—19 дн. По истечении срока инкубации эмбрионы

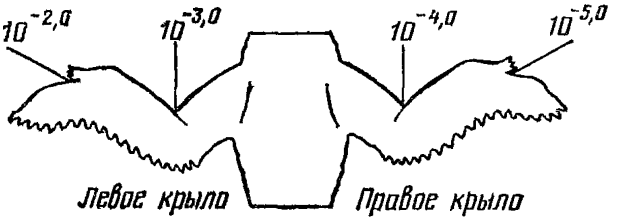


Рис. 1. Схема титрования ВСР на цыплятах.

вскрывают, освобождают ХАО и расправляют ее на чашке Петри, несколько раз промывают физиологическим раствором. Подсчет образовавшихся бляшек проводят на темном фоне при косом освещении. Титр вируса = lg ср. арифметического количества бляшек на ХАО + lg разведения вируса (наибольшего, давшего положительный эффект) + объем введенного вируса. Выражают титр в БОЕ/мл (бляшкообразующие единицы в 1 мл).

Пример расчета титра вируса: заражено десять 11-дневных эмбрионов вирусом в разведении 10^{-4} по 0,1 мл на ХАО. После 8-дневной инкубации со дня заражения на ХАО образовались бляшки:

1-й эмбрион — 25 бляшек — 1,2 lg*
2-й эмбрион — 50 бляшек — 1,6 lg
3-й эмбрион — 4 бляшки — 0,6 lg
4-й эмбрион — 0 бляшек
5-й эмбрион — 30 бляшек — 1,5 lg
6-й эмбрион — 60 бляшек — 1,7 lg
7-й эмбрион — 50 бляшек — 1,6 lg
8-й эмбрион — 0 бляшек
9-й эмбрион — 25 бляшек — 1,2 lg
10-й эмбрион — 30 бляшек — 1,5 lg

10,9:8=1,36 lg**

* Бляшки, образовавшиеся на ХАО (в численном выражении), переводят по таблице Брадиса в логарифмы.

** Сумму логарифмов делят на общее количество ХАО с бляшками и определяют среднее арифметическое число бляшек в логарифмах.

8.6. Вируссодержащим материалом для РН служит 20 %-ная суспензия опухоли цыпленка, индуцированная одним из типовых штаммов ВСР. Суспензию опухоли готовят в среде 199 или в физиологическом растворе с добавлением стерильного мелко растертого стекла, 100 ЕД/мл гиалуронидазы и антибиотиков (смесь пенициллина и стрептомицина по 100 ЕД/мл). Суспензию освобождают от клеток центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 30—40 мин. После центрифугирования из надосадочной жидкости готовят десятикратные разведения ВСР от 10^{-1} до 10^{-4} в среде 199 или физиологическом растворе в объеме 10 мл.

8.7. Постановка РН в культуре ФЭК. Для реакции используют первично трипсинизированную культуру ФЭК, свободных от вирусов лейкоза-саркомы. Через 24—48 ч отбирают матрацы с хорошим монослоем и готовят субкультуру с концентрацией клеток 200—300 тыс. на 1 мл питательной среды. Субкультуру разливают по 1,3 мл в пенициллиновые флаконы или пробирки. Готовят разведения исследуемых и гипериммунных типоспецифических сывороток на среде Игла от 1 : 2 до 1 : 128 в объеме 0,5 мл. К каждому разведению сыворотки добавляют равный объем разведения суспензии ВСР на среде Игла с антибиотиками, содержащей в 0,1 мл 100 $ОД_{50}$. Смесь тщательно перемешивают и оставляют для контакта при комнатной температуре. Через 2 ч 0,2 мл смеси вносят в пенициллиновые флаконы или пробирки с субкультурой ФЭК. На каждое разведение сыворотки берут не менее 4 флаконов или пробирок, которые выдерживают в термостате при температуре 37,6 °С в течение 4—6 сут.

Контроли к РН: контроль клеток незараженной субкультуры (трансформация клеточного монослоя отсутствует); контроль вируса — каждым разведением вируса заражают по 4 флакона с субкультурой ФЭК (наличие очагов трансформации); контроль на стерильность ингредиентов, питательных сред и смеси вируса и сыворотки (полное отсутствие бактериальной и грибковой микрофлоры в посевах).

Учет результатов РН проводят микроскопически на 5—6-й день после постановки реакции при наступлении выраженной трансформации клеточного монослоя. По наибольшему разведению исследуемой сыворотки, нейтрализующей 100 $ОД_{50}$ ВСР, устанавливают вируснейтрализующую активность сыворотки, которую выражают в $ЕД_{50}$ (эффективных доз).

8.8. Постановка РН на эмбрионах кур. В четыре пробирки вносят равные объемы исследуемой сыворотки в разведении 1 : 2 в среде 199 или на стерильном физиологическом растворе и четыре десятикратных разведения антигена от 10^{-2} до 10^{-5} 4 типовых штаммов ВСР.

Порядок внесения компонентов в пробирки следующий: исследуемая сыворотка крови — 0,3 мл; среда 199 или физиологический раствор — 0,3 мл; антиген (ВСР) в 4 разведениях — 0,6 мл. Смесь сыворотки и вируса оставляют для контакта при комнатной температуре на 2 ч. По истечении этого срока данную смесь инъецируют в дозе 0,1 мл на ХАО эмбрионов. Каждым разведением смеси заражают по 10 эмбрионов. Эмбрионы инкубируют в условиях термостата при 37,6 °С в течение 8 сут.

Контроль реакции: смесь, состоящую из равных объемов вирусодержащей суспензии типовых штаммов ВСР соответствующих разведений и физиологического раствора, инъецируют в дозе 0,1 мл на ХАО эмбриона кур. Учет результатов реакции проводят через 8 дн. инкубации. Опытные и контрольные эмбрионы вскрывают и подсчитывают бляшки на ХАО. Индекс нейтрализации равен титру ВСР в контроле минус титр ВСР в опыте. Положительно реагирующими считают сыворотки с индексом нейтрализации, равным или больше 0,5 lg.

8.9. Постановка РН на цыплятах. Реакцию ставят в два этапа: первый этап — в пробирках, где контактируют смесь вируса с сывороткой при комнатной температуре 2 ч; второй этап — заражение цыплят полученной смесью для учета нейтрализации вируса. Для первого этапа готовят 10-кратные разведения вируса в пределах его титра, а затем в стерильные пробирки вносят равные объемы исследуемой сыворотки в разведении 1 : 2 и ВСР в разведении 10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4}; 10^{-5}. После 2-часового контакта при комнатной температуре по 0,1 мл смеси вводят в 4-е точки крыловых перепонок 2-недельных цыплят. Одной смесью сыворотки с ВСР заражают по 4 цыпленка. В контроле равные объемы указанных разведений ВСР смешивают с равным количеством физиологического раствора. Контрольные смеси инокулируют 8—10 цыплятам в тех же дозах и в те же точки, что и испытуемые (рис. 2). Все подопытные и контрольные цыплята находятся под наблюдением в течение 3 нед.

Первый учет реакции у цыплят проводят на 8-й день после начала опыта, затем в течение последующих 2 нед цыплят осматривают каждые 3 дня. Появление опухоли на месте инъекции оценивают знаком плюс, а отсутствие опухоли — знаком минус.

Реакция нейтрализации считается положительной, если ВСР в

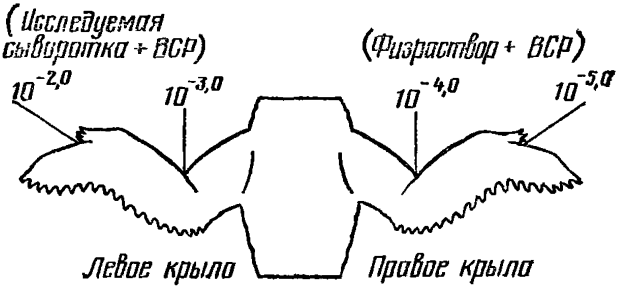


Рис. 2. Схема введения смесей.

смеси с исследуемой сывороткой не проявил биологической активности (не вызвал образования опухоли у подопытных цыплят).

Титр вируса в контроле и титр вируса в опыте подсчитывают по методу Рида и Менча и выражают в $ОД_{50}$. Индекс нейтрализации (ИН) равен разности титра вируса в контроле и в опыте. Положительно реагирующей считают сыворотку с ИН=1,5 lg и выше.

9. Методика выделения вирусов лейкоз-саркомной группы.

9.1. Исходный вируссодержащий материал для выделения вирусов: а) лейкоза — внутренние органы птиц с характерными для этого заболевания изменениями и эмбрионы кур-вирусоносителей; б) саркомы — опухоли во внутренних органах, на серозных оболочках, под кожей и в мышцах. Диагноз на лейкоз и саркому при этом подтверждают гистологическим исследованием отобранных и фиксированных в 10 %-ном растворе формалина кусочков опухолей, нервов и внутренних органов: печени, селезенки, почек, поджелудочной железы, яичника. Исключают болезнь Марека. Патматериал для вирусологических исследований берут с соблюдением правил асептики тотчас после вскрытия павшей или убитой птицы. Материал от больной лейкозом птицы хранят при температуре минус 70 °С или в жидком азоте; от кур, больных саркомой, — при минус 20 °С. При необходимости траспортировки материал доставляется в консерванте. Консервант готовят следующим образом: в 250 мл стерильной бидистиллированной воды, подогретой до 80 °С, растворяют 13,75 г глюкозы. Раствор охлаждают до 40 °С и добавляют к нему антибиотики. Затем 250 мл х. ч. глицерина нагревают до 100 °С и после охлаждения до 40 °С смешивают с раствором глюкозы.

Подготовка патматериала к исследованию. Кусочки органов или опухоли тщательно отмывают от консерванта и крови фосфатно-буферным раствором или раствором Хенкса с pH 7,4—7,6. Из отмытого патматериала готовят 30—70 %-ный гомогенат на среде 199 с антибиотиками. Гомогенат центрифугируют при 3 тыс. об/мин в течение 20 мин. Супернатант сливают в стерильные флаконы и фильтруют через фильтр Зейтца (фильтровальные пластины ЕК с величиной пор 0,1 нм), pH фильтрата должен быть в пределах 7,4—7,6. Бесклеточный фильтрат исследуют в РСК на наличие ГС-антигена. Для вирусологических исследований используют только РСК-положительный фильтрат, так называемый «тканевой» вирус (схема 3). Бесклеточный фильтрат контролируют на отсутствие посторонней

Схема 3

Получение «тканевого» вируса

Гистологическое исследование

Саркомный материал хранят в стерильных флаконах при минус 20 °С

Опухоли, паренхиматозные органы больной птицы

Лейкозный материал хранят в стерильных флаконах при минус 70 °С или в жидком азоте

Гомогенат

Центрифугирование 20 мин при 3 тыс. об/мин

РСК для обнаружения ГС-антигена

Фильтрация надосадочной жидкости через фильтр Зейтца

Контроль на отсутствие посторонней микрофлоры

РСК положительный материал — «тканевой» вирус

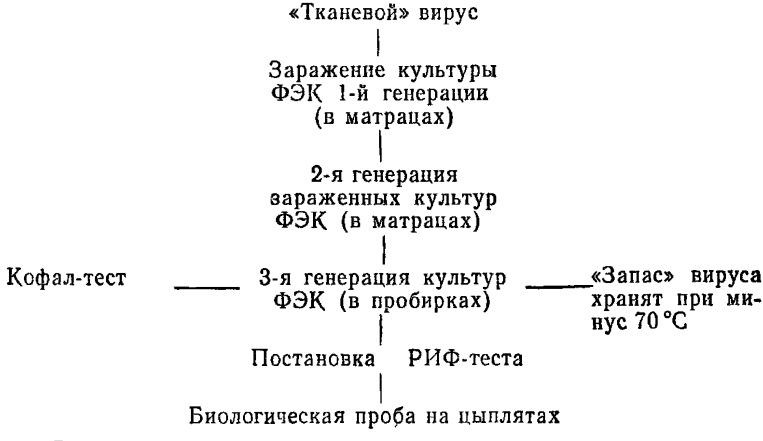
микрофлоры. Вирусы лейкоз-саркомной группы выделяют и идентифицируют на одной из следующих моделей: ФЭК, 8—11-дневных эмбрионах кур или 1—10-дневных цыплятах. Эмбрионы и цыплята должны быть свободными от контаминации вирусами лейкоза-саркомы и чувствительными к заражению вирусом саркомы Рауса 4 серологических подгрупп: A, B, C, D.

Выделение вируса лейкоза: а) готовят первично трипсинизированную культуру ФЭК; б) отбирают матрацы со сплошным монослоем без следов дегенерации клеток; в) на монослой ФЭК инокулируют исследуемый «тканевой» вирус в виде бесклеточной надосадочной жидкости в дозе 0,2 мл на см² площади матраца; г) матрацы с зараженной культурой ФЭК выдерживают в термостате при 37° С 60 мин (время адсорбции вируса); д) по истечении времени адсорбции «тканевой» вирус сливают с монослоя культуры ФЭК. Затем монослой однократно промывают рабочим раствором любой питательной среды или фосфатно-буферным раствором, pH 7,4—7,6; е) в матрацы с культурой ФЭК вносят поддерживающую питательную среду и продолжают культивировать при 37 °С в течение 3—4 дн. По истечении этого срока готовят третью генерацию культуры ФЭК в пробирках; к) культуры ФЭК в пробирках делят на три части: «запас» вируса на длительное хранение, для постановки РИФ-теста и контроля. «Запас» культурального вируса лейкоза хранят при температуре минус 70 °С или в жидком азоте до получения окончательного ответа в РИФ-тесте или кофал-тесте. В положительном на лейкоз случае, по данным РИФ- или кофал-теста, культуральный вирус используют для постановки биопробы на 1—2-суточных цыплятах. В отрицательном на лейкоз случае, по данным РИФ-теста, и положительном, по кофал-тесту, исследуемый материал для накопления вируса дополнительно 2—3 раза пассируют в культуре ФЭК или на куриных эмбрионах. С этой целью: а) куль-

туру ФЭК, зараженную «тканевым» вирусом, по истечении 3—4 сут культивирования трехкратно замораживают и размораживают, фильтруют через фильтр Зейтца и исследуют в кофал-тесте; б) кофал-положительный фильтрат («культуральный» вирус) используют для заражения новой партии культуры ФЭК, которую исследуют в РИФ-тесте. При получении в РИФ-тесте дважды отрицательного ответа исследуемый материал исключают из опыта ввиду отсутствия вируса лейкоза. Наличие вируса лейкоза в исследуемой культуре ФЭК подтверждается положительными результатами кофал- и РИФ-тестов; выделение «культурального» вируса лейкоза и его идентификация — с помощью РИФ- и кофал-тестов (схема 4 и табл. 6).

Схема 4

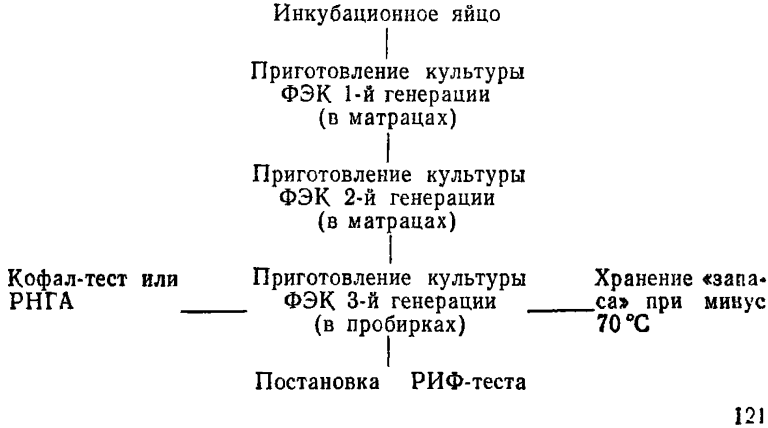
Получение «культурального» вируса и его исследование



Выделение вируса лейкоза из эмбрионов кур-вирусоносителей проводят по схеме 5.

Схема 5

Выделение вируса лейкоза из эмбрионов кур-вирусоносителей



6. Пример идентификации вируса лейкоза с помощью РИФ- и кофал-тестов

Вариант результатов	Культура ФЭК, зараженная ВСР, подгрупп																Контроль — ФЭК не заражены ВСР				Оценка результатов	
	A				B				C				D									
РИФ-теста	Номера пробирок с культурой ФЭК																17	18	19	20	кофал-теста	РИФ-теста
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	ФЭК контаминированы вирусом лейкоза подгруппы С
2	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	ФЭК генетически устойчивы к заражению ВСР подгруппы С
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	Вирус лейкоза в ФЭК отсутствует
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ФЭК генетически устойчивы к заражению ВСР 4 подгрупп: A, B, C, D
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ФЭК контаминированы (спонтанно) вирусом саркомы

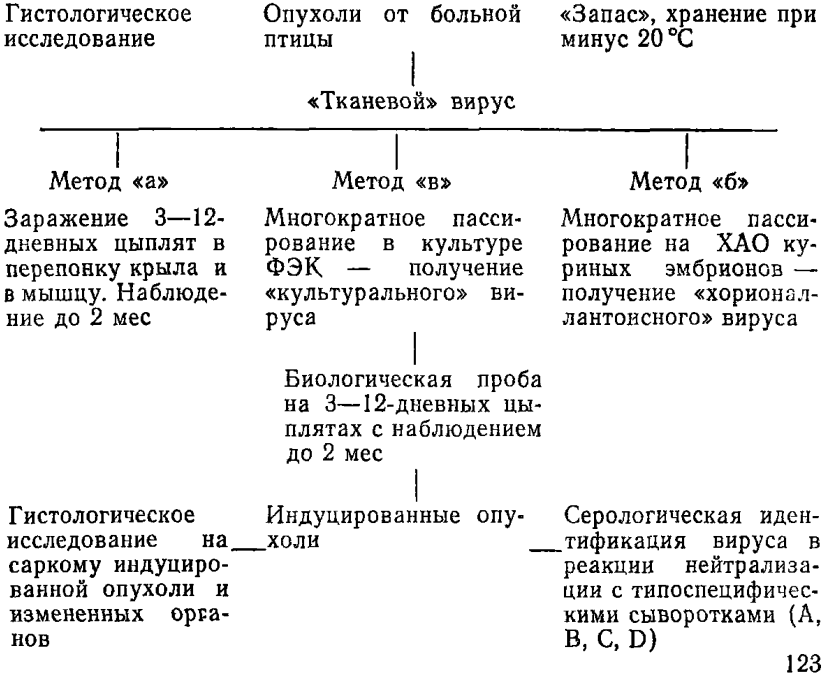
Обозначения: для кофал-теста (—) — отсутствие ГС-антигена, (+) — присутствие ГС-антигена; для риф-теста (—) — отсутствие очагов трансформации, (+) — наличие очагов трансформации.

Инкубационное яйцо, полученное от кур-вирусоносителей (положительно реагирующих, по данным кофал-теста и РНГА), инкубируют в течение 9—10 дн. Из эмбриона готовят первичную культуру ФЭК, из нее получают третью генерацию ФЭК, которую исследуют в РИФ-тесте. При постановке РИФ-теста контролем служит культура ФЭК, не зараженная ВСР. Контрольную культуру ФЭК используют для исключения генетической резистентности к ВСР методом кофал-теста (должен отсутствовать ГС-антиген вируса лейкоза). При получении положительных результатов на наличие вируса лейкоза в РИФ- и КОФАЛ-тестах исходный материал (ФЭК 3-й генерации) используют для постановки биопробы на цыплятах с целью окончательного подтверждения наличия вируса лейкоза.

«Тканевой» и «культуральный» вирусы лейкоза вводят внутрибрюшинно 10 подопытным цыплятам 1—3-дневного возраста в дозе 0,2—0,3 мл. Контрольным цыплятам вводят тем же путем и в той же дозе питательную среду, которую использовали для приготовления вируса. За контрольными и подопытными цыплятами наблюдают 5—6 мес. Раз в месяц от цыплят обеих групп получают сыворотку крови и исследуют ее на наличие ГС-антигена вируса лейкоза в кофал-тесте и типоспецифических (ТС) антител в реакции нейтрализации в культуре ФЭК. По окончании опыта или в случае гибели цыплят исследуют на лейкоз их внутренние органы гистологическим методом и в РСК. Биопроба считается положительной при подтверждении лейкоза гистологическим методом исследования и обнаружении в сыворотке крови подопытных цыплят группоспецифического антигена и типоспецифических антител. Если заболевание у подопыт-

Схема 6

Методы выделения вируса саркомы от птиц



ных цыплят протекает латентно, патоморфологические изменения в органах могут отсутствовать, но в сыворотке крови обязательно устанавливают ГС-антиген и ТС-антитела.

Выделение вируса саркомы. Вирус саркомы выделяют тремя методами заражения (*схема 6*): а) цыплят «тканевым» вирусом; б) эмбрионов «тканевым» вирусом с последующей постановкой биопробы на цыплятах; в) культуры ФЭК «тканевым» вирусом с последующей постановкой биопробы на цыплятах.

метод «а». «Тканевой» вирус в дозе 0,2 мл вводят в перепонку крыла и в мышцу груди 3—12-дневным цыплятам. За подопытными цыплятами наблюдают до 2 мес. В положительном случае в местах введения инокулята образуются опухоли;

метод «б». «Тканевой» вирус многократно пассируют в куриных эмбрионах. Для заражения и проведения пассажей используют куриные эмбрионы 8—9-дневного возраста. «Тканевой» вирус в дозе 0,2 мл наносят на ХАО куриных эмбрионов.

Зараженные куриные эмбрионы инкубируют при 37 °С до 18—19-дневного возраста, после чего их вскрывают и осматривают ХАО. В случае наличия вируса саркомы на ХАО обнаруживают специфические бляшки, количество которых увеличивается с каждым пассажем. Из ХАО, на которых обнаружены бляшки, готовят бесклеточный фильтрат и исследуют его на наличие ГС-антигена в РСК для подтверждения специфичности изменений на ХАО. РСК-положительный бесклеточный фильтрат используют для заражения на ХАО новой партии куриных эмбрионов. На куриных эмбрионах проводят не менее 10 пассажей с целью получения наибольшего количества специфических бляшек на ХАО. Вируссодержащий материал последнего пассажа в дозе 0,2 мл вводят в перепонку крыла и в мышцу груди 3—12-дневных цыплят. В положительном случае у цыплят возникают опухоли на месте введения инокулята;

метод «в». «Тканевой» вирус многократно пассируют в культуре ФЭК первой генерации. В случае репродукции вируса саркомы на 4—7-е сут в монослое культуры ФЭК 2-й генерации образуются очаги трансформации. Трансформированные культуры ФЭК трижды быстро замораживают и оттаивают, фильтруют через фильтр Зейтца. Бесклеточный фильтрат исследуют в кофал-тесте. Кофал-положительным материалом заражают цыплят в дозе 0,2 мл. Показателем наличия вируса саркомы является возникновение на месте введения инокулята опухоли (саркомы) у цыплят, экспериментально зараженных исследуемым материалом. Цыплят с развившимися опухолями убивают. Опухоли вылущивают. Кусочки опухолей и внутренних органов от убитых подопытных цыплят исследуют гистологически на саркому. Из этих же опухолей готовят бесклеточный фильтрат, который исследуют в РСК на наличие ГС-антигена ВСР и в РН в культуре клеток ФЭК с типовыми сыворотками к ВСР четырех подгрупп для серологической идентификации выделенного вируса саркомы.

Условия хранения и методы пассирования выделенных вирусов лейкоза и саркомы.

Вируссодержащий материал («культуральный», «хорионаллантоисный» и «тканевой» вирусы) расфасовывают по 3—8 мл в стерильные флаконы и закрывают резиновыми пробками.

Опухолевый материал, содержащий вирус лейкоза, хранят при минус 70 °С или в жидком азоте (минус 196 °С). Материал, содержащий вирус саркомы, хранят при минус 20 °С.

Вирус лейкоза пассируют ежемесячно в культуре ФЭК или куриных эмбрионах. Титр вируса лейкоза определяют в РИФ-тесте после каждого пассажа.

Вирус саркомы пассируют на цыплятах не реже 4 раз в год. После каждого пассажа вирус титруют на куриных эмбрионах.

Срок проведения исследований

РСК	до 10 дн.
Кофал-тест	до 15 дн.
РНГА	до 1 дня
Метод иммунофлуоресценции	до 7 дн.
РИФ-тест	до 15 дн.
РН	до 10 дн.
Выделение вируса саркомы	до 3 мес.
Выделение вируса лейкоза	до 6 мес.

Наставление подготовлено с учетом экспериментальных данных по изучению лейкоза птиц, полученных во ВНИИБП, при участии ВГНКИ и Центральной ветеринарной лаборатории.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агар мясо-пептонный 83, 92
Альбумин бычий 63, 64
Аппарат Киппа 35, 39

Бульон мясо-пептонный 92
— триптозно-фосфатный 113

Гемолизин 105
Гемолитическая система (гемсистема) 56, 105
Жидкость Барбагалло 170, 188
— Руге 127

Иммуноасцитическая жидкость (ИАЖ) 13

Йодный реактив Мелена 79

Комплемент 16, 24, 105

Метод гельминтоскопии 164, 176
— биопсии 176
— биохимический 179, 187
— Вишняускаса 160
— Гнединой 175
— Ковоана 175
— комбинированный 177
— микроагглютинации с помощью аппарата Такачи 85, 105
— раздавленной капли 198, 204, 210, 213, 215, 226
— световой микроскопии (трихинеллоскопии) 179
— седиментации с целлофановыми пленками 160
— Щербовича 185
— Фюллеборна 183
Методика Бермана 171, 183
— Кивако 176
— комбинированная в модификации Котельникова и Хренова 173
Методика культивирования личинок стронгилят и лавроскопии 168
— седиментации с центрифугированием по Котельникову, Корчагину и Хренову 172
— упрощенная модификация методики Бермана 171
— флотации 160, 164, 166, 176

Окраска гистопрепаратов по Ленцу 11
— — — Туревичу 11
— мазков по Борману — Гайнуллиной 7
— — — Бурри 227
— — — Лейшману 225, 228
— — — Михину 6
— — — Морозову 127
— — — Муромцеву 6
— — — Нохту 70
— — — Паппенгейму 70
— — — Пашену 127
— — — Романовскому 191, 199, 211, 215, 216, 225, 228
— — — Романовскому — Гимзе 21
— — — Селлерсу 6
— — — Стемпу 21
— — — Щуренковой 191

Перевиваемая линия почки свиньи (СПЭВ) 92
Первично-трипсинизированная культура клеток почки свиньи (ПЭС) 41, 92
— — эмбриона коров (ПЭК) 58
— — тестикулов бычка (ТБ) 58

Раствор азотнокислого натрия 185
— азотнокислого свинца 159, 160, 173
— азотнокислого серебра 127
— Альсевера 96
Раствор аммиачной селитры 164, 166, 173, 176
— борной кислоты 184
— буферный борантный 157
— веронал-мединаловый 12, 13, 149
— гексаметафосфата 56, 61
— гипосульфита натрия 185
— забуференного глицерина 181
— забуференный физиологический (ЗФР) 82
— лимоннокислого натрия 97
— мертиолята 40, 98, 156
— сернокислого цинка 160, 171, 172
— соляной кислоты 179

— уксусной кислоты 177
— фосфатно-буферный 9, 66, 96
— Хенкс 53, 81
— хлорида цинка 177
— электролита 68
— Эрла 100
Реакция гемагглютинации (РГА) 36, 60
— гемадсорбции (РГАд) 42, 59
— диффузионной преципитации (РДП) 55, 61, 141, 155
— длительного связывания комплемента (РДСК) 16, 23, 28
— ИАТ 151
— иммунофлуоресценции (ИФ) 54, 79, 80, 91, 111
— иммуноэлектроосмиофореза (РИЭОФ) 147
— кольцепреципитации в капилляре 182
— нейтрализации (РН) 42, 81, 91, 94, 115, 117
— нейтрализации вирусных гемагглютининов (РНВГ) 63
— непрямой гемагглютинации (РНГА) 64, 65, 66, 82, 84
— непрямой иммунофлуоресценции 180
— подавления иммунофлуоресценции 54, 91
— радиальной иммунодиффузии (РРИД) 71, 76, 78
— связывания комплемента (РСК) 23, 24, 56, 57, 192, 199, 219
— — конглютинирующего комплекса 207
— торможения гемагглютинации (РТГА, или РЗГА) 43, 60
— — гемадсорбции (РТГАд) 42, 60
— — *непрямой гемагглютинации* (РТНГА) 62, 63, 142
— формалиновая 205, 226

Среда 199, 81, 92
— 0,5 %-ного гидролизата лактальбумина 81, 92, 113
— Игла 97, 100
— Игла (МЕМ) 113
— Китта — Тароцци 83, 92
— пептонно-агаровая 211
— Петровского 211
— поддерживающая 87, 92
— ростовая 92
— Сабуро 134

Тельца Бабеша — Негри 5, 6
Тканевая цитопатическая доза (ТЦД) 64, 103
Термолабильные ингибиторы 35, 95
Термостабильные ингибиторы 35, 95

Цитопатическое действие (ЦПД) 58, 81, 87, 93

Эритроцитарный диагностикум 12, 65

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 3

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ И РИККЕТСИОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Болезни, общие для всех видов животных 5
Бешенство 5
Методические указания по лабораторной диагностике бешенства 5
Болезнь Ауески 12
Методические указания по лабораторной диагностике болезни Ауески животных 12
Лихорадка Ку 16
Методические указания по серологической диагностике лихорадки Ку животных 16
Хламидийные инфекции 20
Методические указания по лабораторным исследованиям на хламидийные инфекции сельскохозяйственных животных 20
Болезни лошадей 33
Грипп 33
Временное наставление по лабораторной диагностике гриппа лошадей 33
Ринопневмония 40
Методические указания по лабораторной диагностике ринопневмонии лошадей 40
Инфекционная анемия 44
Временные методические указания по лабораторной диагностике инфекционной анемии лошадей 44
Методика постановки реакции диффузионной преципитации (РДП) для серологической диагностики инфекционной анемии лошадей 48
Болезни крупного и мелкого рогатого скота 51
Респираторно-кишечные инфекции крупного рогатого скота . 51
Методические указания по лабораторной диагностике вирусных респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота 51
Методические указания по серодиагностике инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) 65
Лейкоз крупного рогатого скота 67
Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота 67

Аденоматоз овец и коз 76
Временные методические указания по лабораторной диагностике аденоматоза овец и коз 76
Временная методика постановки реакции по определению гиперпротеинемии у овец и коз 79
Болезни свиней 79
Вирусный (трансмиссивный) гастроэнтерит 79
Методические указания по лабораторной диагностике вирусного (трансмиссивного) гастроэнтерита свиней . . 79
Временное наставление по применению набора для серодиагностики трансмиссивного гастроэнтерита свиней . . 84
Энтеровирусный гастроэнтерит 86
Методические указания по лабораторной диагностике энтеровирусного гастроэнтерита свиней 86
Грипп 89
Наставление по применению набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа свиней 89
Энзоотический энцефаломиелит (болезнь Тешена) . . . 91
Методические указания по лабораторной диагностике энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней 91
Парвовирусная болезнь 95
Методические указания по диагностике парвовирусной болезни свиней 95
Болезни птиц 97
Болезнь Марека (нейролимфоматоз птиц) 97
Методические указания по лабораторной диагностике болезни Марека (нейролимфоматоза) птиц 97
Вирусный энтерит гусят 102
Методические указания по лабораторной диагностике вирусного энтерита гусят 102
Лейкоз птиц 104
Временное наставление по лабораторной диагностике лейкоза птиц 104
Оспа птиц 125
Методические указания по лабораторной диагностике оспы птиц 125
Инфекционный ларинготрахеит кур 128
Временное наставление по лабораторной диагностике инфекционного ларинготрахеита кур 128
Временные методические указания по определению биологической активности вирусвакцины из штамма ВНИИБТ против инфекционного ларинготрахеита птиц 132
Инфекционный бронхит кур 138
Наставление по лабораторной диагностике инфекционного бронхита кур 138
Болезни пушных зверей и пчел 145
Миксоматоз кроликов 145
Временные методические указания по лабораторной диагностике миксоматоза кроликов 145
Алеутская болезнь норок (плазмоцитоз) 147
Наставление по применению набора антигена и контрольных сывороток в реакции иммуноэлектроосмофореза для серологической диагностики алеутской болезни норок . 147
Наставление по прижизненной диагностике алеутской болезни норок при помощи йодно-агглютинационного теста 151

Трансмиссивная энцефалопатия норок 152
Временные методические указания по лабораторной диагностике трансмиссивной энцефалопатии норок . . . 152
Вирусный энтерит норок 154
Временные методические указания по гистологическому исследованию на вирусный энтерит норок 154
Гепатит песцов, лисиц и собак 155
Временное наставление по постановке реакции диффузионной преципитации (РДП) в агаровом геле для диагностики вирусного гепатита песцов, лисиц и собак . . . 155
Острый паралич пчел и заболевание, вызываемое нитевидным вирусом пчел 157
Методические указания по постановке реакции диффузионной преципитации (РДП) в агаровом геле для диагностики острого паралича пчел и заболевания, вызываемого нитевидным вирусом пчел 157

ПАРАЗИТАРНЫЕ БОЛЕЗНИ

Гельминтозы 159
Методические указания по диагностике гельминтозов животных 159
Методические указания по лабораторным исследованиям на гельминтозы плотоядных 176
Трихинеллез 179
Методические указания по лабораторной диагностике трихинеллеза животных 179
Временное наставление по применению реакции непрямой иммунофлуоресценции для прижизненной диагностики трихинеллеза свиней 180
Трихинеллез клеточных пушных зверей и его диагностика 182
Приложение к «Инструкции по профилактике ликвидации трихинеллеза в звероводческих хозяйствах (фермах)» . 182
Стронгилоидоз 183
Методические указания по лабораторным исследованиям на стронгилоидоз животных 183
Телязиоз 184
Методические указания по лабораторным исследованиям на телязиоз крупного рогатого скота 184
Акантоцефалезы 185
Методические указания по лабораторным исследованиям на акантоцефалезы животных (макроканторинхоз свиней, полиморфоз, филиколлез водоплавающих птиц) . . . 185
Промежуточные (дополнительные) хозяева 186
Методические указания по лабораторным исследованиям промежуточных (дополнительных) хозяев на личинки гельминтов 186
Протозоозы 190
Пироплазмидозы 190
Извлечение из временной инструкции о мероприятиях по борьбе с пироплазмидозами животных 190
Анаплазмоз крупного и мелкого рогатого скота 191
(Приложение № 1 к «Инструкции по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота») 191
Методика постановки РСК для диагностики анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота 192

Эритрозооноз 194
Методические указания по лабораторным исследованиям на эритрозооноз овец 194
Трипанозомозы 198
Методические указания по лабораторным исследованиям на случную болезнь лошадей, ослов, мулов 198
Извлечение из инструкции по борьбе с трипанозомозом верблюдов, лошадей, ослов, их гибридов и собак . . . 204
Временные Методические указания по постановке и учету реакции связывания конглютинирующего комплекса (РСКК) для диагностики су-ауру у верблюдов . . . 207
Трихомоноз 209
Методические указания по лабораторной диагностике трихомоноза крупного рогатого скота 209
Балантидиоз 212
Извлечение из временной инструкции о мероприятиях по борьбе с заболеванием свиней балантидиозом . . . 212
Гистомоноз 213
Методические указания по лабораторным исследованиям на гистомоноз (тифлогепатит) птиц 213
Токсоплазмоз 216
Методические указания по лабораторным исследованиям на токсоплазмоз животных 216
Временное наставление по применению токсоплазменного антигена КазНИВИ и ИЗ АН КазССР в реакции связывания комплемента (РСК, РДСК) для серологической диагностики токсоплазмоза и токсоплазмоносительства у животных 219
Лейшманиоз 224
Методические указания по лабораторным исследованиям на лейшманиоз собак 224
Боррелиоз (спирохетоз) птиц 226
Методические указания по лабораторным исследованиям на боррелиоз (спирохетоз) птиц 226
Безноитиоз крупного рогатого скота 227
Методические указания по лабораторным исследованиям на безноитиоз крупного рогатого скота 227
Акариозы 228
Саркоптоидозы 228
Извлечение из инструкции о мероприятиях по борьбе с саркоптоидозами (чесоткой) овец и коз 228
Извлечение из инструкции о мероприятиях по борьбе с саркоптоидозами (чесоткой) пушных зверей и кроликов . 229
Извлечение из инструкции о мероприятиях по предупреждению и ликвидации саркоптоза свиней 230
Извлечение из инструкции по профилактике и ликвидации заболевания северных оленей чесоткой (саркоптозом) . 231
Инвазионные болезни пчел 232
Нозематоз 232
Методические указания по лабораторным исследованиям на нозематоз медоносных пчел 232
Предметный указатель 235

gost.e-ecolog.ru