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 апробацию 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

ВЕЗИКУЛЯРНАЯ БОЛЕЗНЬ И ВЕЗИКУЛЯРНАЯ ЭКЗАНТЕМА

5.13. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВЕЗИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ И ВЕЗИКУЛЯРНОЙ ЭКЗАНТЕМЫ СВИНЕЙ

(утверждены 15 июня 1979 г., б/н)

1. Общие положения.

1.1. Лабораторная диагностика везикулярной болезни (ВБС) и везикулярной экзантемы синей (ВЭС) заключается в:

- обнаружении антигена в патологическом материале (везикулы, везикулярная жидкость) методами реакции связывания комплемента (РСК), реакции диффузионной преципитации (РДП);
- выделении возбудителя из патологического материала в культуре клеток и его идентификации в серологических реакциях: иммунофлуоресценции (ИФ), РСК или реакции нейтрализации (РН);
- выявлении антител в крови больных и переболевших животных (ретроспективная диагностика) в одной из серологических реакций РСК, РДП, РН;
- биологической пробе;
- исследовании физико-химических свойств выделенного вируса.

1.2. При диагностике везикулярной болезни и везикулярной экзантемы проводят дифференциацию везикулярного стоматита и ящура в РСК или РДП и биологической пробе с использованием сопутствующих каждой инфекции диагностических наборов, выпускаемых биологической промышленностью.

1.3. Лабораторный диагноз на везикулярную болезнь и везикулярную экзантему свиней ставят на основании положительных результатов исследования патологического материала на обнаружение антигена с помощью одной из серологических реакций (РСК, РДП) или выделения возбудителя в РСК или РН или установления двукратного нарастания титра антител в организме животных с учетом эпизоотологических и клинических данных.

1.4. Для постановки лабораторного диагноза методом обнаружения антигена в патологическом материале требуется 1...3 дня, для выявления вируса и его идентификации — до 10 дней, для выявления прироста антител в крови животных — от 2 до 4 недель.

2. Взятие и подготовка материала для исследования.

2.1. В лабораторию для исследования направляют стенки невскрывшихся везикул и везикулярную жидкость от 2...5 больных животных в количестве не менее 2 г. Везикулы от свиней берут с кожи «пятачка», венчика, мякишей или вымени, предварительно промыв эти участки кожи водой с антибиотиками (1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл). Стенки везикул срезают ножницами, помещают во флакон или пробирки, опечатывают и в термосе со льдом направляют в лабораторию с нарочным.

Для ретроспективной диагностики на исследование направляют пробы крови от 5...10 переболевших животных.

2.2. В лаборатории везикулы отмывают физиологическим раствором, растирают в ступке и добавляют 1:5 фосфатно-буферный раствор с pH 7,2...7,4. После двукратного замораживания и оттаивания взвесь центрифугируют при 10 000 об/мин на холоде в течение 30 мин. Надосадочную жидкость исследуют в РСК на наличие антигена. Для РДП используют неразведенную везикулярную жидкость из

невскрывшихся везикул или 35...50%-ную взвесь на физиологическом растворе из стенок везикул.

2.3. Для выделения вируса в культуре клеток готовят 10%-ную взвесь из везикул на фосфатно-буферном растворе или питательной среде и, не подвергая замораживанию и оттаиванию, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. В надосадочную жидкость добавляют антибиотики по 1000 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина и используют для заражения.

3. Обнаружение типоспецифического антигена в патологическом материале в РСК.

3.1. Компоненты реакции:

- испытуемый антиген, приготовленный, как указано в п. 2.2;
- два типоспецифических комплементсвязывающих (КС) антигена вируса ВБС (0-72 и Т-75);
- два типоспецифических КС антигена вируса ВЭС (С-72 и А-48);
- контрольный (отрицательный) антиген;
- две типоспецифических комплементсвязывающих сыворотки к вирусу ВБС (0-72 и Т-75);
- две типоспецифических КС сыворотки к вирусу ВЭС (С-72 и А-48);
- контрольная (отрицательная) сыворотка;
- гемолизин;
- комплемент;
- эритроциты барана (2%-ная взвесь).

3.2. Испытуемый антиген исследуют в двукратных разведениях, остальные антигены и сыворотки — в удвоенном титре.

3.3. Постановка реакции: реакцию ставят в пробирках, титрование гемолизина и комплемента проводят в объеме 2,5 мл, а основной опыт — в объеме 0,5 мл.

РСК проводят в четыре этапа: титрование гемолизина, титрование комплемента, титрование антигенов и сывороток в присутствии комплемента и постановка главного опыта.

3.3.1. Титрование гемолизина. Для титрования гемолизина готовят основное его разведение 1:100 (0,2 мл гемолизина и 9,8 мл физиологического раствора, с учетом того, что гемолизин в ампуле разведен глицерином), затем — разведение 1:1000 и из этого разведения готовят все последующие по схеме 1.

Титром гемолизина считают наивысшее его разведение, дающее полный гемолиз эритроцитов.

Рабочим разведением гемолизина считают четырехкратную концентрацию его предельного титра с учетом консервирования глицерином.

Например, если предельный титр гемолизина 1:4000, рабочее разведение его составит 1:1000, то берут его в соот-

Схема 1

Приготовление разведений гемолизина

Необходимые разведения / Компоненты	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000	1:6000
Гемолизин 1:1000	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Физиологический раствор	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0

Схема 2

Титрование гемолизина

Разведение гемолизина / Компоненты	1:1000	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
Гемолизин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Комплемент 1:20	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Встряхивают, помещают на водяную баню при 37°С на 30 мин						
Учет степени гемолиза	0	0	0	0	+	++++

Примечание: 0 — полный гемолиз; ++++ — полная задержка.

ношении 2:1000 (0,2 мл гемолизина и 99,8 мл физиологического раствора).

Для приготовление гемсистемы используют гемолизин в рабочем разведении и смешивают с равным количеством 2%-ной взвеси эритроцитов и выдерживают при комнатной температуре в течение 10...15 мин.

3.3.2. Титрование комплемента. Комплемент титруют в разведении 1:20 в различных дозах по схеме 3.

Схема 3

Титрование комплемента

Компоненты реакции	Процентное содержание комплемента в дозах							
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Комплемент 1:20	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4
Физиологический раствор	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1
Гемолизин в рабочем разведении	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Выдержать на водяной бане при 37°С 15 мин								
Учет результата	++++	++	+	0	0	0	0	0

Титром комплемента считают наименьшее его количество, при котором наступает полный гемолиз эритроцитов. Для титрования антигенов, сывороток и постановки главного опыта используют 2 дозы комплемента, которые соответствуют пробирке, находящейся через одну пробирку вправо от последней пробирки с полным гемолизом.

По схеме 3 полный гемолиз дают 2% комплемента, следовательно, рабочей дозой комплемента является разведение с содержанием 3% комплемента. Разведение готовят из цельного комплемента.

Например, по схеме 3 в опыт на 100 пробирок требуется 10 мл разведенного комплемента, для этого берут 0,3 мл цельного комплемента и добавляют 9,7 мл физиологического раствора.

3.3.3. Титрование типоспецифических антигенов. Титрование антигенов проводят с целью установления рабочей дозы антигена по схеме 4. Типоспецифические сыворотки используют в двойном титре.

Схема 4

Титрование типоспецифических антигенов

Разведение антигенов / Компоненты	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:16
Антиген типоспецифический	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Сыворотка типоспецифическая	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Водяная баня при 37°С 30 мин								
Гемсистема	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня при 37°С 30 мин								
Учет результата	++++	++++	+++	+	+	0	0	0

Титром антигена считают его наибольшее разведение, давшее со специфической сывороткой задержку гемолиза не менее чем на три креста.

Рабочим разведением антигена считается удвоенный титр антигена. По схеме 4 рабочее разведение антигена будет равно 1:2.

3.3.4. Титрование типоспецифических сывороток проводят по схеме 4, используя разведения их до предельного титра, а антигены — в рабочих разведениях.

3.3.5. Постановка главного опыта РСК. Реакции связывания комплемента ставят в объеме 0,5 мл. Первую фазу реакции (фазу связывания комплемента) проводят на водяной бане при температуре 37°С в течение 20...30 мин. Вторую фазу (фазу выявления) также проводят на водяной бане при температуре 37°С в течение 20...30 мин.

Схема 5

Определение серотипа вирусов ВБС и ВЭС

Компоненты	Сыворотки к типам вирусов				Без сыворотки
	О-72	Т-75	С-72	А-48	
Испытуемый антиген	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Типоспецифическая сыворотка	0,1	0,1	0,1	0,1	–
Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Физиологический раствор	–	–	–	–	0,1
Водяная баня при 37°С, 30 мин					
Гемсистема	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня при 37°С, 30 мин					
Учет результата	++++	–	–	–	–

Учет РСК проводят по 100%-ному гемолизу. Главный опыт ставят по схеме 5.

Учет результатов проводят по схеме 6.

3.4. *Положительной РСК* считается в том случае, когда наблюдается 100%-ная или 75%-ная задержка гемолиза (четыре-три креста) в присутствии одной из типоспецифических сывороток и антигена из испытуемого материала при полной задержке гемолиза в контрольных пробирках с соответствующими специфическими антигенами и сыворотками и при полном гемолизе в пробирках с контрольным — нормальным антигеном и гетерологичными сыворотками.

При получении *сомнительного* результата (один-два креста) РСК повторяют.

При получении повторного сомнительного результата реакцию считают положительной.

При получении *отрицательного* результата в РСК (тепловой вариант с учетом по 100%-ному гемолизу) проводят постановку модифицированной РСК с регистрацией результатов фотоэлектроколориметрией.

Схема 6

Учет результатов постановки РСК

Антигены	Типоспецифические сыворотки в рабочих титрах									Нормальная сыворотка	Без сыворотки
	ВБС шт. 0-72	ВБС шт. Т-75	ВЭС шт. С-72	ВЭС шт. А-48	Ящур			ВС			
					А	О	С	Инд.	Н-Дж.		
Шт. 0-72 станд. (ВБС)	++++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Шт. Т-75 станд. (ВБС)	–	++++	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Шт. С-72 станд. (ВЭС)	–	–	++++	–	–	–	–	–	–	–	–
Шт. А-48 этал. (ВЭС)	–	–	–	++++	–	–	–	–	–	–	–
Испытуемый антиген в виде 20%-ной взвеси, цельн.	++++	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
То же 1:2	+++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
То же 1:4	++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Контрольный антиген	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Без антигена	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечания. Испытуемый антиген относится к 1-му серотипу вируса ВБС шт. 0-72.

Обозначение результатов РСК: ++++ — 100%-ная задержка гемолиза; +++ — 75%-ная задержка гемолиза; ++ — 50%-ная задержка гемолиза; + — 25%-ная задержка гемолиза; – — полный гемолиз.

4. Модифицированный метод РСК с учетом результатов фотоэлектроколориметрии.

4.1. Данный метод используют для исследования проб патологического материала (везикул и везикулярной жидкости) с низкой комплементсвязывающей активностью. Метод основан на учете результатов гемолиза на спектрофотометре (фотоэлектроколориметре) с нефелометром.

4.2. Компоненты реакции:

- испытуемый антиген, приготовленный, как указано в п. 2.2;
- два типоспецифических КС антигена вируса ВБС (0-72 и Т-75);
- два типоспецифических КС антигена вируса ВЭС (С-72 и А-46);
- контрольный (отрицательный) антиген;
- две типоспецифические КС сыворотки к вирусу ВБС (0-72 и Т-75);
- две типоспецифичеекие КС сыворотки к вирусу ВЭС (С-72 и А-48);
- три типоспецифические сыворотки к вирусу ящура типов А, О и С;
- две типоспецифические сыворотки к вирусу везикулярного стоматита типов «Индиана» и «Нью-Джерси»;
- контрольная (отрицательная) сыворотка;
- гемолизин;
- комплемент;
- эритроциты барана, приготовленные на вероналовом буфере;
- физиологический раствор.

4.3. Приготовление стандартной суспензии эритроцитов.

Эритроциты барана 3...4 раза отмывают и из осадка готовят 0,6...0,7%-ную взвесь на вероналовом буфере. Стандартную взвесь готовят по следующей схеме:

№ пробирок	Суспензия отмытых эритроцитов (мл)	Вероналовый буфер (мл)	Физиологический раствор	Оптическая плотность
1	0,25	1,75	3,0	0,51
2	0,25	1,75	3,0	0,50
3	0,25	1,75	3,0	0,49

В РСК используют взвесь эритроцитов, в которой средний показатель оптической плотности должен быть равен 0,50.

4.3.1. Примечание: Состав вероналового буфера:

- барбитуровая кислота — 2,875 г;
- барбитурат натрия — 1,875 г;
- сернокислый магний — 0,616 г;
- хлористый кальций — 0,080 г;
- хлористый натрий — 45,5 г;
- дистиллированная вода — 2 л.

Вначале в мерной колбе на 2 л растворяют барбитуровую кислоту в 500 мл подогретой дистиллированной воды, а затем все остальные компоненты с добавлением воды до метки. Раствор стерилизуют автоклавированием при 110°С в течение одного часа. Хранят до 2 мес. при 4°С. Перед употреблением разбавляют 2:3 дистиллированной водой.

4.4. Гемолитическая система. Готовят разведение гемолизина соответственно удвоенному его титру в обычной РСК. Смешивают равные объемы раствора гемолизина и стандартной суспензии эритроцитов. Смесь выдерживают в течение 15 мин при комнатной температуре.

4.5. Титрование комплемента проводят трехкратно. Комплемент разводят 1:200 и титруют по следующей схеме:

Комплемент 1:200	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,66
Вероналовый буфер	1,3	1,75	1,20	1,15	1,10	1,05	1,00	0,95	0,90
30 мин при 57°С на водяной бане									
Гемсистема	0,5								
Физ. раствор	3,0								

Учет результатов.

Полученные результаты наносят на миллиметровую бумагу и находят точку, соответствующую 50%-ному гемолизу эритроцитов (ОП = 0,25). В опыт берут 1,2 CH_{50} комплемента.

4.6. Постановка основного опыта. Готовят двукратные разведения испытуемого антигена от 1:5 до 1:400, а далее

в зависимости от примерной исходной активности антигена. Разливают по 0,5 мл каждого разведения антигена. Количество пробирок зависит от числа специфических сывороток, взятых в опыт. Вносят по 0,5 мл рабочего разведения сывороток согласно титру в обычной РСК. Добавляют комплемент в рабочем разведении и инкубируют при 37°С в течение 30 мин. Затем вносят по 0,5 мл гемсистемы, выдерживают снова 30 мин при 37°С и проводят учет реакции.

4.7. Учет реакции. В левый кюветодержатель ФЭКН-57 ставят кювету с буфером, а в правый кюветодержатель — кювету с измеряемой пробой. Вращением правого барабана устанавливают стрелки прибора на нуль. Проводят отсчет показания прибора по правому барабану. Разница показания прибора на 0,15 и более между опытной пробиркой и контрольной — на антикомплементарность антигена + сыворотки, принимается за положительный результат. Разница 0,10...0,14 — за сомнительный, 0,10 и ниже — за отрицательный результат.

4.8. Настройку прибора ФЭКН-57 и измерение проводят по инструкции, прикладываемой к прибору.

Для измерения использует фотоэлектроколориметр с нефелометром. Учет результатов проводят с использованием кюветы на 10 мм при переключении на нефелометрическое измерение с красным светофильтром (№ 8).

При малых объемах материала объем каждого реагента можно уменьшить до 0,25 мл, добавить физраствора 1,5 мл. Измерение при этом проводят в кюветах на 5 мм.

5. Выявление типоспецифического антигена в патологическом материале методом РДП.

5.1. Для постановки РДП используют 1,5%-ный агар, приготовленный на дистиллированной воде с добавлением 1,6% хлористого натрия. Для сохранения агара к нему добавляют 10%-ный раствор фенола из расчета 50 мл раствора на 1 л агара и 0,03 г мертиолята. Такой агар хранится в течение двух месяцев. Перед постановкой реакции его разливают в чашки Петри и штампом делают лунки (диаметр лунок 5 мм, расстояние между лунками 5 мм).

5.2. Компоненты реакции:

- испытуемые антигены, приготовленные, как указано в п. 2.2;
- два контрольных типоспецифических антигена штаммов ВБС (0-72 и Т-75);
- контрольный типоспецифический антиген штамма ВЭС (С-72);
- две типоспецифические сыворотки к штаммам ВБС (0-72 и Т-75);
- типоспецифическая сыворотка к штамму ВЭС (С-72);
- типоспецифические сыворотки к 7 типам вируса ящура.

5.3. Постановка реакции. В центральные лунки вносят испытуемый и контрольный антигены, в периферические — типоспецифические сыворотки. Чашки инкубируют при 37°С. Учет реакции проводят через 24, 48 и 72 ч.

5.4. Учет реакции. Положительная реакция характеризуется образованием четкой, белого цвета одной или двух линий преципитации между антигеном и гомологичной сывороткой.

Возбудитель относят к тому виду (типу), с сывороткой которого испытуемый антиген дает положительную реакцию.

6. Выделение вируса в культуре клеток.

6.1. Для выделения вируса используют перевиваемую (ПП) или первично-трипсинизированную культуры клеток почки поросенка. Для заражения используют 10%-ную взвесь из стенок везикул, приготовленную, как указано в п. 2.3.

Одной исследуемой пробой заражают не менее 4...6 пробирок или флаконов с культурой клеток, внося в каждую пробирку по 0,1 мл (во флакон — по 0,5 мл) взвеси, предварительно удалив из пробирок питательную среду и промыв культуру клеток раствором Хенкса.

Пробирки выдерживают в течение 60 мин при комнатной температуре, после чего в них добавляют поддерживающую питательную среду (0,9 мл в пробирки, 10 мл — во флаконы) и инкубируют в течение 3...5 сут, не меняя

среды. Для контроля оставляют 4...6 пробирок с незараженной культурой клеток.

6.2. Поддерживающая среда состоит из раствора Хенкса с 0,5%-ным гидролизатом лактальбумина с добавлением по 200 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, с pH 7,2...7,4.

6.3. Учет реакции. Для выявления цитопатического действия вируса в зараженных культурах их ежедневно просматривают под малым увеличением микроскопа в течение 3...5 дней. При наличии вируса ВБС или ВЭС в исследуемом материале ЦПД обнаруживается через 24...48 ч. Оно характеризуется мелкоклеточной деструкцией по всему монослою с последующим образованием мелких конгломератов и отслоением от стекла. Для вируса ВЭС характерно появление светопреломляющих округлых клеток по всему монослою с последующим образованием гроздевидных скоплений, которые затем также отслаиваются от стекла.

6.4. При наличии ЦПД-вируса на два креста (деструкция 50% клеток) проводят его идентификацию в РСК (как описано в п. 3) или в реакциях нейтрализации и иммунофлуоресценции.

7. Идентификация выделенного вируса с помощью метода иммунофлуоресценции (прямой вариант).

7.1. Метод иммунофлуоресценции используется только для идентификации вируса ВЭС.

7.2. Выделенный вирус выращивают в культуре клеток на покровных стеклах. При появлении ЦПД (через 6...8 ч инкубации) покровные стекла вынимают из пробирок и многократно отмывают фосфатно-буферным раствором, затем стекла подсушивают на воздухе и фиксируют метиловым спиртом в течение 5 мин.

7.3. Для выявления вируса ВЭС используют специфическую флуоресцирующую сыворотку в рабочем разведении. Для контроля используют нормальную флуоресцирующую сыворотку в том же разведении.

7.4. Проведение реакции. Фиксированные препараты многократно отмывают фосфатно-буферным раствором, высушивают на воздухе в течение 10...20 мин и обрабатывают флуоресцирующей сывороткой. Для контроля одно-

типные препараты обрабатывают нормальной флуоресцирующей сывороткой. Препараты помещают во влажную камеру и выдерживают в течение 30 мин при 37°С. Окрашенные препараты многократно промывают фосфатно-буферным раствором, высушивают на воздухе, покрывают забуференным глицерином (9:1) и покровным стеклом и микроскопируют.

7.5. Оценка результатов. Положительной считается реакция, при которой в препарате наблюдается специфическое флуоресцирующее свечение клеток или цитоплазмы клеток не менее чем на два креста в трех и более полях зрения.

7.6. В сомнительных случаях окончательный диагноз на ВЭС ставят по результатам РН.

8. Идентификация и серотипирование выделенного вируса ВБС и ВЭС в реакции нейтрализации.

8.1. Идентификацию и серотипирование выделенного вируса проводят с помощью типоспецифических вирусней-трализующих сывороток:

- две сыворотки к вирусам ВБС (к штаммам 0-72 и Т-75);
- две сыворотки к вирусам ВЭС (к штаммам С-72 и А-46).

8.2. При необходимости дифференциации выделенного вируса от вируса ящура и вируса везикулярного стоматита в РН дополнительно используют сыворотки к указанным вирусам.

8.3. Постановка реакции. Выделенный вирус в культуре клеток отстаивают при комнатной температуре (20°С), затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин и надосадочную жидкость используют для постановки РН. Из надосадочной жидкости готовят десятикратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-6}) на 0,5%-ном гидролизате лактальбумина и к 0,5 мл каждого разведения добавляют такой же объем типоспецифической сыворотки. В реакции используют в четырехкратном титре сыворотки, инактивированные при температуре 57°С в течение 30 мин. Смесь встряхивают, выдерживают при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем по 0,2 мл каждой смеси вносят в пробирки с культурами и доливают в них поддерживающую среду до

объема 1 мл. Перед заражением проводят однократное отмывание монослоя поддерживающей средой.

8.3.1. Контроли:

- незараженная культура клеток;
- культура клеток, зараженная выделенным вирусом в разведении от 10^{-1} до 10^{-6};
- культура клеток, в которую внесены типоспецифические сыворотки в разведении 1:10.

Культуры клеток инкубирует при 37°С и ежедневно просматривают под микроскопом.

8.4. Учет реакции. Культуры просматривают в течение 3...5 дней до выявления ЦПД в пробирках с культурой, зараженной вирусом.

По выявлении ЦПД определяют титр инфекционности выделенного вируса (предельное его разведение, которое вызывает ЦПД в 50% зараженных пробирок не менее, чем на два креста).

Предельное разведение вируса, дающее ЦПД, обозначают как одну дозу $ТЦД_{50}$ (титр высчитывают по методу Рида и Менча). Индекс нейтрализации высчитывают по разности показателей $ТЦД_{50}$ выделенного вируса в присутствии типоспецифических сывороток и определяют серотиповую принадлежность вируса.

9. Ретроспективная диагностика.

9.1. Для ретроспективной диагностики исследуют парные или однократно отобранные сыворотки переболевших животных. Сыворотки исследуют на наличие антител с помощью типоспецифических антигенов в РСК, РДП или РН.

9.2. Реакция связывания комплемента. РСК проводят в варианте длительного связывания.

Компоненты реакции:

- типоспецифические антигены ВБС (штаммы 0-72 и Т-75);
- типоспецифические антигены ВЭС (штаммы С-72 и А-48);
- контрольный отрицательный антиген;
- типоспецифические сыворотки к штаммам (0-72, Т-75, С-72 и А-48);
- контрольная отрицательная сыворотка;
- испытуемые сыворотки, инактивированные;

- гемолизин к эритроцитам теленка;
- комплемент.

9.3. В РСК используют 3%-ную взвесь эритроцитов теленка и гемолизин соответственно к ним. Комплемент используют биофабричного производства. Типоспецифические антигены предварительно титруют с соответствующими типоспецифическими сыворотками для определения рабочего разведения, как указано в п. 3.7.

9.4. Для дифференциации везикулярного стоматита и ящура при исследовании сывороток используют соответствующие антигены.

9.5. Схема постановки главного опыта при ретроспективной диагностике.

Ингредиенты	Количество (мл)
Испытуемая сыворотка в двукратных разведениях, начиная с 1:4 до 1:32	0,1
Антиген в рабочем разведении	0,1
Комплемент в рабочей дозе	0,1
Выдерживают при 4°С в течение 18 ч	
Гемсистема	0,2
Выдерживают на водяной бане при 37°С 30...40 мин	
Учет реакции	

9.6. Схема учета главного опыта при ретроспективной диагностике.

Ингредиенты		Разведение сывороток			
Сыворотки	Антигены	1:4	1:8	1:16	1:32
От больного животного в остром периоде	1. Типоспецифический антиген штамма 0-72	++++	++	0	0
	2. Типоспецифический антиген штамма Т-75	++	+	0	0
	3. Типоспецифический антиген штамма С-72	0	0	0	0
	4. Типоспецифический антиген штамма А-48	0	0	0	0

Ингредиенты		Разведение сывороток			
Сыворотки	Антигены	1:4	1:8	1:16	1:32
	5. Контрольный (отрицательный) антиген	0	0	0	0
	6. Без антигена (контрольная сыворотка на антикомплементарность)	0	0	0	0
От реконвалесцента	1. Типоспецифический антиген штамма 0-72	++++	++++	++++	++
	2. Типоспецифический антиген штамма Т-75	++++	++++	++	0
	3. Типоспецифический антиген штамма С-72	0	0	0	0
	4. Типоспецифический антиген штамма А-48	0	0	0	0
	5. Контрольный (отрицательный) антиген	0	0	0	0
	6. Без антигена (контрольная сыворотка на антикомплементарность)	0	0	0	0

Ретроспективный диагноз считается положительным при двукратном нарастании титра специфических антител к вирусу ВБС или ВЭС.

9.7. Реакция диффузионной преципитации. Для исследования в РДП используют парные пробы сывороток и типоспецифические антигены ВБС (штаммы 0-72 и Т-75), ВЭС (штаммы С-72 и А-48), ящура (А, О, С, Сат-1, Сат-2, Сат-3 и Азия-1), а также контрольные положительные и контрольные отрицательные сыворотки. Постановку и учет РДП проводят, как указано в пп. 4.3 и 4.4.

9.8. Реакция нейтрализации. Для реакции нейтрализации используют парные сыворотки свиней и вирусы ВБС (штаммы 0-72 и Т-75), ВЭС (штаммы С-72 и А-48) и вирусы ВС и ящура (7 серотипов). Испытуемые сыворотки инактивируют и разводят от 1:8 до 1:64. Вирусы предварительно титруют в культуре клеток и используют в РН в дозе 1000 $ТЦД_{50}$ в 1 мл. Постановку реакции проводят общепринятым методом.

9.9. Ретроспективный диагноз считается положительным при нарастании титра антител в парных сыворотках или при обнаружении титра антител 1:32 и выше у 10 и более свиней от числа однократно обследованных.

10. Биологическая проба.

10.1. Биопробу проводят на белых мышах однодневного возраста и морских свинках. Материалом для заражения служит взвесь из стенок везикул (1:10) от больных свиней.

10.2. Испытуемый материал вводят морским свинкам интраплантарно в дозе 0,2 мл, мышам — интрацеребрально в дозе 0,02 мл. Наблюдают за животными в течение 10 дней после заражения.

10.3. Морские свинки чувствительны к вирусам везикулярного стоматита и ящура, мыши чувствительны только к вирусу ВБС. Через 36...72 ч при наличии вируса ВБС мыши гибнут с явлениями паралича. Из органов и тканей павших животных готовят суспензию (как указано в п. 2.2) и исследуют в РСК на наличие антигена вируса ВБС.

11. Идентификация вируса ВБС и ВЭС и дифференциация их от вирусов ящура и везикулярного стоматита по физико-химическим свойствам.

11.1. Для определения чувствительности выделенного вируса к эфиру и к pH 5,0, а также стабилизирующего действия $MgCl_2$ при 50°С используют нативную культуральную вируссодержащую жидкость.

11.2. Определение чувствительности вируса к эфиру. Вируссодержащую жидкость в количестве 5...10 мл смешивают с равным объемом эфира, встряхивают в течение 20 мин при комнатной температуре и смесь оставляют на 18...20 ч при 4°С. Затем смесь центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин, верхний слой, содержащий эфир, удаляют, а нижний слой, содержащий вирус, титруют в культуре клеток ПП.

11.3. Определение чувствительности вируса к pH 5,0. К 9 частям среды с pH 5,0 (доводят до нужного значения добавлением 1 N HCl) добавляют 1 часть вируссодержащего

материала, выдерживают в течение 1...2 ч при комнатной температуре и затем титруют в культуре клеток ПП.

11.4. Определение стабилизирующего действия 1 М $MgCl_2$ при 50°С. Вируссодержащий материал смешивают с равным объемом 2 М $MgCl_2$ и подогревают в течение одного часа при 50°С, затем его титруют в культуре клеток ПП.

11.5. Сравнительные данные физико-химических свойств вирусов.

Свойства	ВЭС	ВБС	ВС	Ящур
Чувствительность к эфиру	Устойчив	Устойчив	Неустойчив	Устойчив
Чувствительность к pH 5,0	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Неустойчив
Стабилизация 1 М $MgCl_2$	Не стабилизируется	Стабилизируется	Не стабилизируется	Не стабилизируется

По результатам физико-химических исследований проводят идентификацию и дифференциацию вирусов ВБС, ВЭС, везикулярного стоматита (ВС) и ящура.

С изданием настоящих Методических указаний считается утратившим силу «Временное наставление по лабораторной диагностике везикулярной болезни свиней», утвержденное Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 19 февраля 1975 г.

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 Киппа *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 «ZETECT-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) 133
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 «ZETECT-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-мэди 280
4.2. Временное наставление по применению набора диагностикумов для серологической диагностики висна-мэди 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 эцефаломиелит (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»
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
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: gost.e-ecolog.ru

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

Для розничных покупателей:

интернет-магазины:
Издательство «Лань»: gost.e-ecolog.ru
«Сова»: gost.e-ecolog.ru : «Ozon.ru»: gost.e-ecolog.ru
«Библион»: gost.e-ecolog.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 gost.e-ecolog.ru 499)270-73-59

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

ЛАНЬ®
Since 1993

СДЕЛАНО В С. ПЕТЕРБУРГЕ
2009

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

ISBN 978-5-8114-1882-4

gost.e-ecolog.ru