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

1.2.
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВИРУСА ЯЩУРА

(одобрены и рекомендованы 15 октября 1973 г., б/н)

I. ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА ЯЩУРА

Для выделения вируса из патологического материала необходимо располагать достаточным количеством такого материала, иметь восприимчивых к вирусу ящура сельскохозяйственных или лабораторных животных, а также чувствительные к вирусу культуры клеток; располагать условиями, исключающими возможность выноса вируса за пределы диагностической лаборатории.

1. Правила отбора патологического материала.

Для исследования отбирают патологический материал в виде стенок афт от 2...3 больных животных в количестве не менее 5 г. У крупного рогатого скота берут стенки созревших непрорвавшихся афт с языка, у свиней — с «пятачка» или вымени, у мелкого рогатого скота — с беззубого края верхней челюсти, с кожи межкопытной щели или венчика. Афты должны быть свежими, плотной консистенции, не издавать гнилостного запаха.

Материалом для исследования могут служить и лимфатические узлы или костный мозг, реже другие паренхима-

тозные органы. Для прижизненного обнаружения вируса ящура можно использовать слюну и кровь больных животных. Для исследования на вирусоносительство у животных специальным зондом берут соскоб слизистой оболочки глотки и пищевода.

При отборе патологического материала пользуются стерильным инструментом или посудой. Патологический материал помещают в стерильные флаконы или банки с навинчивающимися колпачками с плотной резиновой прокладкой, в которые до 1/3 объема наливают консервирующую жидкость, состоящую из смеси равных частей химически чистого глицерина и фосфатно-буферного раствора pH 7,4...7,6. На флаконы наклеивают этикетку с наименованием вида патологического материала, даты отбора и адреса хозяйства.

Флаконы или банки с отобранным материалом ставят в металлический непроницаемый контейнер, опечатывают и помещают в термос со льдом. К материалу прилагают сопроводительную записку, в которой указывают дату взятия материала, от какого вида животных и какой материал взят, сообщают подробную эпизоотическую обстановку по ящуру в хозяйстве.

2. Подготовка материала к исследованию.

При доставке в лабораторию стенок афт от больных животных для определения типа и варианта вируса ящура необходимо в максимально короткий срок провести исследование в РСК. С этой целью из афтозного материала готовят антиген по следующей методике. Стенки афт отмывают физиологическим раствором pH 7,4...7,6, высушивают фильтровальной бумагой, взвешивают, измельчают и растирают в фарфоровой ступке с битым нейтральным стеклом до получения однородной массы.

Антигены для РСК готовят в виде 33%-ной суспензии (1:3) путем добавления к полученному весу афтозного материала двойного количества физиологического раствора. Полученную взвесь экстрагируют при комнатной температуре в течение 2 ч и промораживают при температуре −6...−20°С в течение 5...18 ч.

После размораживания антиген центрифугируют 10... 15 мин при 5000 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливают и инактивируют при 58°С в течение 40 мин. После инактивации надосадочную жидкость повторно центрифугируют и используют в РСК.

Эффективность выделения вируса из патологического материала повышается при очистке и концентрировании вируссодержащих суспензий. Для этой цели в суспензию используемого материала добавляют фреон-113 в равном количестве к ее объему или хлороформ (10% к объему суспензии). После гомогенизации в течение 15...20 мин и центрифугирования в течение 20 мин проводят концентрирование надосадочной жидкости полиэтиленгликолем с молекулярным весом 6000. К надосадочной жидкости добавляют 7,5% полиэтиленгликоля, встряхивают до растворения и оставляют в холодильнике при температуре 4°С на 2 ч. Затем центрифугируют при 4000...6000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость удаляют, а образовавшийся осадок разбавляют фосфатным буфером или физиологическим раствором в объеме, в 10...20 раз меньшем, чем исходное количество взятой суспензии. Подготовленный материал используют для испытания на наличие вируса.

3. Выделение вируса.

На основании опыта отечественных и зарубежных исследователей для выделения вируса ящура может быть предложена следующая схема (рис. 1).

Лучшим, хотя и дорогостоящим, методом обнаружения вируса ящура в патологическом материале является биопроба на крупном рогатом скоте. 10%-ную суспензию полученного материала вводят телятам в возрасте 3 мес. и старше, по 0,1 мл в слизистую оболочку языка в нескольких точках. Появление афт на месте введения материала с последующим подтверждением специфичности материала в РСК свидетельствует о наличии вируса ящура. Этот метод применяется в диагностической практике очень редко. Чаще всего для постановки биопроб используют мышат-сосунов 4...6-дневного возраста и морских свинок весом не

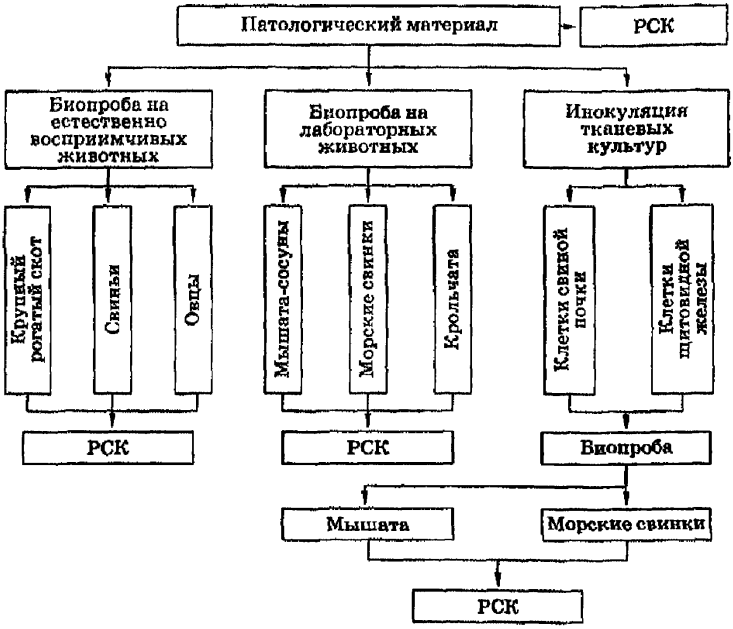


Рис. 1
Схема выделения вируса

менее 500 г. Мышатам-сосунам 10%-ную суспензию испытуемого материала вводят под кожу в дозе 0,2 мл или внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл. Появление парезов и параличей конечностей, а затем гибель мышат с подтверждением специфичности в РСК свидетельствует о наличии вируса ящура в испытуемом материале. Морским свинкам 10%-ную суспензию испытуемого материала вводят методом туннелирования внутрикожно в плантарную поверхность лапок. Появление афт на месте введения материала с последующим подтверждением их специфичности в РСК свидетельствует о наличии вируса ящура.

Высокочувствительным методом выделения вируса является инокуляция культур клеток. В этих целях чаще всего используют однослойную культуру первично-трипсинизированных клеток почек свиней (СП). 10%-ную суспензию испытуемого материала вносят в 4...6 пробирок с культу-

рой клеток. Для этого удаляют питательную среду и добавляют 0,1...0,2 мл испытуемого материала. Лучше испытуемый материал инокулировать в увеличенных дозах (20 мл) в большие сосуды типа матрасов Повитской емкостью до 5 л. Пробирки или матрасы оставляют в горизонтальном положении около часа для контакта клеток с испытуемым материалом. После этого добавляют питательную среду. Наблюдение за инфицированными культурами клеток ведут в течение трех дней. При появлении выраженного цитопатического действия (++++) культуральную жидкость собирают и сохраняют в замороженном состоянии. Специфическая дегенерация клеток при подтверждении ее специфичности в РСК свидетельствует о наличии вируса ящура в испытуемом материале.

II. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА

1. Серологические методы

А. Реакция связывания комплемента по 100%-му гемолизу[1]

Реакция связывания комплемента применяется для определения типов и подтипов (вариантов) вируса ящура, вызвавших заболевание животных, а также для проверки производственных штаммов вируса ящура при изготовлении вакцин и лабораторных штаммов в научно-исследовательской работе.

Компоненты реакции:

а) гемолизин — сыворотка кроликов, гипериммунизированных эритроцитами барана;

б) эритроциты барана — в виде 2%-ной взвеси (из осадка отмытых эритроцитов) на физиологическом растворе;

в) комплемент — свежая или сухая нормальная сыворотка морских свинок;

---

[1] Наставление по определению типов и подтипов (вариантов) вируса ящура утверждено Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 27 августа 1968 г.

г) сыворотки морских свинок, гипериммунизированных стандартными типовыми производственными или эпизоотическими штаммами вируса ящура;

д) антигены контрольные — из эталонов типовых и производственных штаммов вируса ящура, испытуемые — из эпизоотических, производственных или лабораторных штаммов вируса от крупного рогатого скота, овец, свиней, крольчат и животных других видов;

е) физиологический раствор — 0,85%-ный раствор химически чистой поваренной соли на дистиллированной воде.

а) Гемолизин

Для определения титра гемолизина из него готовят серию разведений на физиологическом растворе и затем испытывают его активность в этих разведениях.

Выпускаемый биофабрикой гемолизин консервирован глицерином (1:1), поэтому для приготовления первого разведения 1:100 берут 0,2 мл гемолизина и 9,8 мл физиологического раствора. Затем в отдельной пробирке готовят следующее разведение — 1:1000, для чего к 1 мл гемолизина в разведении 1:100 добавляют 9 мл физиологического раствора. Разведение 1:1000 является основным, из которого готовят все последующие: 1:1500, 1:2000, 1:3000, 1:4000 и т. д.

Схема 1

Приготовление разведений гемолизина

Необходимое разведение / Компоненты	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000	1:6000
Гемолизин 1:1000 (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Физиологический раствор (мл)	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0

Водяная баня 10 мин при температуре 37...38°С, после чего проводят учет реакции.

Титром гемолизина считается наивысшее разведение, дающее полный гемолиз эритроцитов.

Рабочим разведением гемолизина считается четырехкратная концентрация от его предельного титра.

Схема 2

Титрование гемолизина

Разведение гемолизина / Компоненты	1:1000	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
Гемолизин (мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор (вместо антигена и сыворотки) (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Комплемент в разведении 1:20 (мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты, 2%-ная взвесь (мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

В дальнейшем перед постановкой реакции гемолизин обычно не титруют, а рабочее разведение готовят, исходя из предельного титра, установленного при его выпуске биофабрикой и указанного на этикетке. Например, если предельный титр гемолизина 1:3000, рабочее разведение будет 1:750. Поскольку гемолизин, выпускаемый биофабрикой, консервирован глицерином (1 часть глицерина на 1 часть гемолизина), для приготовления рабочего разведения гемолизина берут вдвое больше, т. е. 2:750, или 0,2 мл гемолизина и 74,8 мл физиологического раствора.

Для дальнейшей работы гемолизин в рабочем разведении смешивают с равным количеством 2%-ной взвеси эритроцитов. Полученная смесь называется гемолитической системой (гемсистемой).

б) Эритроциты

Полученную кровь барана дефибринируют, фильтруют через марлю в центрифужные пробирки, затем центрифугируют 10 мин при 2000...3000 об/мин. Сыворотку отсасывают, а к осадку эритроцитов добавляют примерно 8...10-кратное количество физиологического раствора, все тщательно

перемешивают и снова центрифугируют, как указано выше. Затем жидкость над осадком удаляют, а к осадку добавляют свежую порцию физиологического раствора, смешивают и центрифугируют. Эту операцию отмывания эритроцитов от сыворотки повторяют до тех пор, пока жидкость над осадком не станет бесцветной (обычно для этого требуется отмывать 3...5 раз). По окончании отмывания жидкость над осадком тщательно отсасывают пипеткой, а из осадка эритроцитов готовят 2%-ную взвесь. Для этого берут 2 мл отмытых эритроцитов и 98 мл физиологического раствора. Для удобства дальнейшей работы готовят гемсистему, которую в процессе употребления часто взбалтывают, так как эритроциты быстро оседают на дно сосуда.

в) Комплемент

Комплемент выпускается биофабриками в сухом виде. Его можно получить и самим, приготовив свежую неинактивированную сыворотку крови от здоровых морских свинок. Титруют комплемент в гемолитической системе и обязательно в день постановки реакции.

Схема 3

Титрование комплемента

Процентное содержание цельного комплемента в дозе / Компоненты	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Комплемент в разведении 1:20	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
Недостающее количество физиологического раствора	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10
Гемолизин в рабочем титре	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты, 2%-ная взвесь	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор вместо антигена и сыворотки	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Комплемент исследуют в разведении 1:20 в следующих дозах: 0,05; 0,10; 0,15 и т. д. с интервалами 0,05 до 0,40 мл. В каждую пробирку недостающее количество до объема 0,5 мл доливают физиологическим раствором (в первую пробирку 0,45 мл физиологического раствора, во вторую — 0,40, в третью — 0,35 и т. д.). Это будет соответствовать 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 и 4% цельного комплемента, содержащегося в дозе 0,5 мл разведения с физиологическим раствором.

Водяная баня 15 мин при температуре 37...38°С, после чего проводят учет реакции.

Титром комплемента считается наименьшее его количество, дающее полный гемолиз эритроцитов. Для работы по определению типов вируса ящура пригоден комплемент, дающий при этих условиях титр не ниже 2,5%.

В дальнейшем для постановки главного опыта комплемент берут с постоянным излишком в 2 условные единицы от титра в его гемолитической системе. Например, если титр комплемента в гемолитической системе 1,5% (см. схему титрования комплемента), для получения рабочего разведения комплемента следует взять 2,5%, что составляет 2 единицы. Разведение комплемента делают из нативного цельного комплемента.

г) Сыворотки

Типоспецифические и вариантные гипериммунные ящурные сыворотки готовят на биофабриках (в институтах) и используют для определения типов и подтипов (вариантов) вируса ящура.

д) Антигены

Типоспецифические и вариантные ящурные антигены готовят из тканей больных ящуром крольчат на биофабриках и в институтах.

Испытуемый антиген (стенки афт с языка крупного рогатого скота, с «пятачка» или вымени свиней, с венчика, межкопытной щели или беззубого края верхней челюсти мелкого рогатого скота и т. д.) готовят по методике, описанной выше (см. п. 2). Присланный на исследование пато-

логический материал в виде стенок афт или других тканей берут в количестве, необходимом для постановки РСК. Остаток патологического материала хранят в холодильнике при температуре –6...–20°С в консерванте и используют для дальнейшего изучения. В случае отрицательных результатов РСК допускается расплодка испытуемого материала на 4...6-дневных мышатах, морских свинках или культуре ткани.

Определение типов вируса ящура

При определении типов вируса ящура перед проведением главного опыта позитивные ящурные сыворотки и антигены не титруют, а используют их в удвоенных титрах. Например, если предельный титр сыворотки, указанный на этикетке, 1:40, то ее удвоенным титром будет разведение 1:20. Если предельный титр антигена, указанный на этикетке, 1:6, то его удвоенным титром будет разведение 1:8.

Испытуемый антиген в реакции исследуют цельным (33%-ная взвесь) и в разведениях 1:2; 1:4, 1:8.

Схема 4

Определение типа вируса (главный опыт)

	Сыворотки типов					Без сыворотки
	О	А	С	САТ-1	Азия-1	
Сыворотка в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	–
Испытуемый антиген в разведении 1:2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент, 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	–	–	–	–	–	0,2
Водяная баня 20 мин при 37...38°С						
Гемсистема	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 мин при 37...38°С						
Результат	++++	–	–	–	–	–

Реакцию связывания комплемента ставят в объеме 1 мл или 0,5 мл.

Одновременно с главным опытом по определению типов вируса ящура ставят контроль ящурных компонентов, участвующих в реакции.

Пример учета результатов постановки РСК

Антигены	Сыворотки в рабочих титрах					Без сыворотки
	О	А	С	САТ-1	Азия-1	
О	++++	–	–	–	–	–
А	–	++++	–	–	–	–
С	–	–	++++	–	–	–
САТ-1	–	–	–	++++	–	–
Азия-1	–	–	–	–	++++	–
Испытуемый антиген цельный	++++	++	–	–	–	+
То же, 1:2	++++	–	–	–	–	–
То же, 1:4	++++	–	–	–	–	–
То же, 1:8	++	–	–	–	–	–
Без антигена	–	–	–	–	–	–

Испытуемый антиген относится к типу О.

Обозначение результатов РСК:

++++ — 100%-ная задержка гемолиза (полная);

+++ — 75%-ная задержка гемолиза;

++ — 50%-ная задержка гемолиза;

+ — 25%-ная задержка гемолиза;

– — полный гемолиз.

В пограничных зонах страны при угрозе проникновения ящура других типов (САТ-2 и САТ-3) в контроль и главный опыт по определению типов включают сыворотки и антигены вируса ящура, регистрируемого в сопредельном государстве.

Определение подтипов (вариантов) вируса ящура

Для определения подтипов (вариантов) вируса ящура или соответствия эпизоотического штамма производственному необходимы те же компоненты, что и при постановке РСК для определения типов, и, кроме того, антигены и сыворотки производственных (вариантных) штаммов вируса ящура.

Перед постановкой РСК с целью определения вариантной принадлежности эпизоотических штаммов вируса ящура определяют активность и вариантную специфичность антигенов и сывороток, используемых в реакции.

Первый учет реакции проводят сразу после водяной бани, а окончательный — через 18 ч после выдерживания пробирок при температуре 12...18°С.

Предельным титром сыворотки считают наивысшее разведение ее, дающее с антигеном гомологичного штамма полную задержку гемолиза эритроцитов (++++), в данном случае разведение 1:40.

Схема 5

Проверка активности вариантной сыворотки A_7

	Разведение сыворотки A_7					
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Сыворотка A_7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген A_7 в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент, 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 мин при 37...38°С						
Гемсистема	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 мин при 37...38°С						
Результат	++++	++++	++++	++++	++	+

Титром антигена считается наивысшее разведение его, дающее с гомологичной сывороткой полную задержку гемолиза эритроцитов, в данном случае разведение 1:6.

По аналогичным схемам проверяют на активность и специфичность сыворотки и антигены других вариантов.

Схема 6

Проверка вариантной специфичности сыворотки A_7

Сыворотка A_7 в предельном титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген A_7 в удвоенном титре	0,2	–	–	–	–
Антиген A_{20} в удвоенном титре	–	0,2	–	–	–
Антиген A_{22} в удвоенном титре	–	–	0,2	–	–
Антиген стандартного типа А в удвоенном титре	–	–	–	0,2	–
Физиологический раствор	–	–	–	–	0,2
Комплемент, 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 мин при 37...38°С					
Гемсистема	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 мин при 37...38°С					
Результат	++++	++	±	+	–

Заключение: сыворотка варианта A_7 специфична.

Схема 7

Проверка активности антигена варианта A_7

Разведение антигена	1:2	1:3	1:4	1:6	1:12	1:16
Количество разведенного антигена	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Сыворотка типа A_7 в предельном титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент, 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 мин при 37...38°С						
Гемсистема	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 мин при 37...38°С						
Результат	++++	++++	++++	+++	++	+

Схема 8

Проверка вариантной специфичности антигена A_7

Антиген A_7 в удвоенном титре	0,2	0,2	0,2	0,2
Сыворотка A_7 в предельном титре	0,2	–	–	–
Сыворотка A_{20} в предельном титре	–	0,2	–	–
Сыворотка A_{22} в предельном титре	–	–	0,2	–

Продолжение схемы 8

Физиологический раствор	–	–	–	0,2
Комплемент, 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 мин при 37...38°С				
Гемсистема	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 мин при 37...38°С				
Результат	++++	++	++	–

Заключение: антиген варианта A_7 специфичен.

Вариантную принадлежность эпизоотического штамма вируса ящура определяют в два этапа.

I этап — предварительное заключение по РСК.

В этом случае проводится исследование в РСК антигена испытуемого штамма вируса с предельными разведениями вариантных сывороток. Антиген относят к тому варианту, с сывороткой которого он и дает положительную РСК в более высоких разведениях.

Примерный результат РСК при определении вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура

Вариантные сыворотки в предельных титрах	Антиген испытуемого штамма					
	цельный	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
A_7	++++	++++	++	+	±	–
A_{20}	++++	++++	++	+	±	–
A_{22}	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Аст	++++	++++	+++	++	+	–
Без сыворотки	–	–	–	–	–	–

Предварительное заключение: испытуемый штамм относится к варианту A_{22}.

II этап — окончательное заключение по РСК.

К началу исследований по II этапу на испытуемый штамм вируса должна быть получена штаммоспецифическая гипериммунная сыворотка. В этом случае опыт перекрестной РСК ставят с сыворотками в предельных титрах

и с антигенами в удвоенных титрах. Испытуемый антиген относится к тому варианту, с сывороткой которого он будет давать наибольшее (++++) связывание.

Окончательное заключение: испытуемый штамм вируса ящура относится к варианту A_{22}.

* * *

В последнее время при определении антигенного соответствия эпизоотического штамма производственному используют схему постановки РСК, в которой предусматривают перекрестное титрование штаммоспецифических сывороток с гомологичным и гетерологичным антигеном[1]. В этом случае антигенное родство между штаммами вируса рассчитывают по формуле Архетти и Хорсфала (1950):

$$R = 100\sqrt{r_1 \cdot r_2},$$

где

$$r_1 = \frac{\text{средний \% задержки гемолиза на каждое разведение сыворотки I к вирусу II}}{\text{средний \% задержки гемолиза на каждое разведение сыворотки I к вирусу I}};$$

$$r_2 = \frac{\text{средний \% задержки гемолиза на каждое разведение сыворотки II к вирусу I}}{\text{средний \% задержки гемолиза на каждое разведение сыворотки II к вирусу II}}.$$

Задержку гемолиза в один крест принимают за 25%, в два креста — 50%, в три креста — 75%, в четыре креста — 100%. Антигенное родство (R) более 70% свидетельствует о том, что штаммы по антигенным свойствам идентичны друг другу и относятся к одному и тому же варианту, от 10 до 70% — к различным вариантам (подтипам) и менее 10% — к различным типам.

При постановке РСК по этой схеме используют гипериммунные сыворотки одинаковой активности с титром не ниже 1:40.

---

[1] Указанный метод апробирован в лаборатории ВНИЯИ и рекомендуется для практического использования в диагностических лабораториях.

Для идентификации вируса с низкой комплементсвязывающей активностью, например антигенов из культурального вируса, применяют модифицированную РСК. Сущность ее в том, что, не изменяя объемов других компонентов, дозу испытуемого антигена увеличивают до 0,4 мл. Сыворотку применяют в удвоенном титре, комплемент — 2 единицы.

Б. Реакция связывания комплемента по 50%-ному гемолизу[1]

Компоненты реакции.

В реакции используют гемолизин и комплемент биофабричного производства, эритроциты барана, консервированные в консерванте Мигулиной, гипериммунные сыворотки морских свинок и антигены (афтозный, лапинизированный или культуральный). В качестве разбавителя используют вероналовый буфер pH 7,3...7,4.

а) Вероналовый буфер

Концентрированный раствор вероналового буфера готовят по прописи:

Раствор А	
NaCl	83,00 г
Na-5,5-диэтилбарбитурат	10,19 г
вода дистиллированная	500,0 мл
1 н. HCl	34,58 мл
Раствор Б	
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	20,3 г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4 г
вода дистиллированная	100 мл

К раствору А добавляют 5 мл раствора Б и при тщательном перемешивании доводят дистиллированной водой до 2000 мл.

[1] Методика постановки РСК по 50%-ному гемолизу освоена сотрудниками ВНИИЯИ в Международной справочной лаборатории Пирбрайте, апробирована в лаборатории ВНИИЯИ и рекомендуется для использования в работе научно-исследовательским учреждениям.

Концентрированный раствор разливают во флаконы, стерилизуют автоклавированием и хранят в холодильнике при температуре +4°С.

Рабочий раствор вероналового буфера готовят по мере надобности перед постановкой реакции путем разбавления одной части концентрированного раствора четырьмя частями дистиллированной воды.

Примерная схема и результат постановки перекрестной РСК для определения вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура

Антигены в удвоенном титре	Штаммоспецифические сыворотки в удвоенном титре (уд. т.) и предельном (п. т.)										Без сыворотки
	Аст.		A_7		A_{20}		A_{22}		Испытуемая		
	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	
Аст	++++	++++	+++	++	++	+	++	+	++	+	–
A_7	++	+	++++	++++	++	+	++	+	++	+	–
A_{20}	++	+	++	+	++++	++++	++	+	++	+	–
A_{22}	++	+	++	+	++	+	++++	++++	++++	++++	–
Испытуемый	++	+	++	+	++	+	++++	++++	++++	++++	–
Без антигена	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

б) Эритроциты барана

Рекомендуется использовать консервированные эритроциты барана не ранее чем через 5 дней после консервирования.

Для приготовления рабочей суспензии смешивают 1 объем осажденных, отмытых эритроцитов барана и 32,2 объема охлажденного рабочего раствора вероналового буфера; 1 мл полученной суспензии лизируют в 9 мл дистиллированной воды и определяют оптическую плотность (ОП) полученного образца.

При отклонении ОП от желаемой более чем на ±0,02 проводят коррекцию по формуле

$$\left(\frac{a}{b}-1\right)\cdot V,$$

где a — ОП исследуемой суспензии; b — ОП желаемой суспензии; V — объем приготовленной суспензии, мл.

в) Гемолизин

Из биофабричных серий кроличьей гемолитической сыворотки, консервированной глицерином, готовят разведения 1:100 путем смешивания 4 мл 5%-ного раствора фенола (на физиологическом растворе), 94 мл рабочего раствора вероналового буфера и 2 мл глицеринизированного гемолизина. Приготовленное разведение гемолизина при температуре +4°С можно хранить до 2 мес. При появлении осадка готовят новое разведение.

Для определения титра гемолизина из приготовленного разведения (1:100) готовят разведения 1:1000, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:4000, 1:8000. В шесть пробирок, помеченных согласно разведениям гемолизина, вносят по 1 мл стандартизированной 2,8%-ной суспензии эритроцитов, добавляют по 1 мл гемолизина соответствующего разведения и выдерживают в водяной бане при температуре 25°С 15 мин. В шесть центрифужных пробирок, маркированных согласно разведениям гемолизина, наливают по 0,4 мл рабочего раствора вероналового буфера, 0,4 мл комплемента (разведенного 1:200 или 1:300), 0,2 мл сенсибилизированных соответствующими разведениями гемолизина эритроцитов. После встряхивания пробирки помещают в водяную баню при температуре 37°С на 1 ч.

Нелизированные эритроциты осаждают центрифугированием при 600g 5 мин. Процент гемолиза в каждой пробирке определяют путем сравнения с цветными стандартами или фотоэлектроколориметрически; гемолиз для каждого разведения отмечается на обычной миллиметровой бумаге, как показано на рисунке 2.

Оптимальное разведение гемолизина определяют по графику. Выбирают такое разведение, чтобы дальнейшее увеличение количества гемолизина (повышение кривой вправо) не вызывало заметного увеличения процента лизиса эритроцитов. Оптимальным считают разведение, обеспечи-

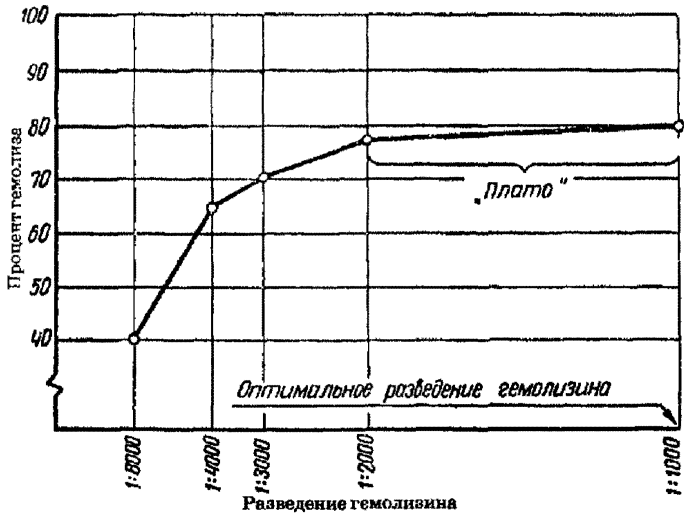


Рис. 2
Титрование гемолизина

вающее небольшой избыток гемолизина, необходимый для воспроизводимости результатов. В примере, приведенном на рисунке 2, оптимальное разведение гемолизина 1:1000.

Сенсибилизация эритроцитов. К стандартизированной 2,8%-ной суспензии эритроцитов небольшими порциями при постоянном помешивании добавляют равный объем гемолизина выбранного разведения. Выдерживают на водяной бане при температуре 25°С 15 мин.

г) Комплемент

Для получения комплемента стабильной активности содержимое 10...20 ампул комплемента биофабричного производства растворяют в дистиллированной воде, смешивают, расфасовывают по 2...3 мл и хранят в замороженном состоянии, отбирая необходимое количество для разового использования.

Титрование комплемента. Из замороженного комплемента на рабочем растворе вероналового буфера готовят се-

рию разведений (например, 1:100, 1:200, 1:250 и 1:300). Комплемент каждого разведения вносят в четыре центрифужные пробирки и разбавляют вероналовым буфером в следующих соотношениях:

1	2	3	4
0,2 мл комплемента	0,25 мл комплемента	0,3 мл комплемента	0,4 мл комплемента
0,6 мл буфера	0,55 мл буфера	0,5 мл буфера	0,4 мл буфера

Затем в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл сенсибилизированных эритроцитов и помещают в водяную баню при температуре 37°С на 30 мин. После инкубации пробирки центрифугируют при 600*g* 5 мин и проводят учет гемолиза по цветным стандартам. Для дальнейших расчетов берут то разведение комплемента, при котором в двух пробирках гемолиз был меньше 50% и в двух — больше 50%.

Процентное отношение лизированных и нелизированных эритроцитов для каждой пробирки выражается пропорцией

$$X = \frac{Y}{100 - Y},$$

где X — процентное отношение; Y — процент гемолиза.

Данные процентного отношения для каждой пробирки наносят на логарифмическую бумагу в виде точек (*A*, *B*, *C* и *D*, рис. 3), точки попарно соединяют линиями (*AB* и *CD*), и центры линий (*E* и *F*) соединяют между собой. Из точки пересечения кривой *EH* и линии, соответствующей 50% гемолиза (*X*), проводят перпендикуляр на ось ординат, где нанесены отметки, соответствующие количеству (мл) разведенного комплемента. Точка пересечения перпендикуляра с осью ординат (*Y*) указывает дозу (мл) комплемента данного разведения, необходимую для обеспечения 50% гемолиза (1 CH_{50}). В приведенном примере такая доза при разведении комплемента 1:200 определена в 0,26 мл.

В реакции титрования антигена используют пять 50%-ных гемолитических единиц комплемента (5 CH_{50}) в объеме 0,4 мл. Для определения количества комплемента, содер-

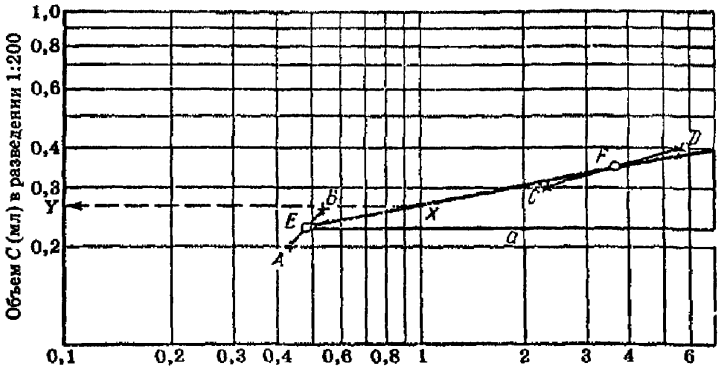


Рис. 3
Графический метод титрования комплемента

жащего в объеме 0,4 мл 5 CH_{50}, составляют пропорцию. Для приведенного примера:

1 CH_{50} (при разведении 1:200) = 0,26 мл.

5 CH_{50} (при том же разведении) = 0,26 · 5 = 1,3 мл.

Отношение % лизированных к % нелизированных эритроцитов:

$$\left(\frac{y}{100-y}\right).$$

При использовании цельного комплемента конечную его концентрацию (X) для получения 5 CH_{50} в 0,4 мл определяют по пропорции

$$\frac{X}{0,4}=\frac{200}{1,3}, \text{ т. е. } \frac{0,4\cdot 200}{1,3}=61.$$

Разведенный комплемент хранят на льду в темной посуде и используют в течение 3...4 ч.

д) Антиген

Для постановки реакции используют афтозный, культуральный или лапинизированный антиген, приготовленный по общепринятой методике.

Титрование антигена. Оптимальное разведение антигена определяют титрованием серии разведений антигена против серии разведений специфической гипериммунной

сыворотки, как показано в таблице 1. Реакцию лучше ставить в лунках панелей из органического стекла в объеме 1 мл. В соответствующие лунки заливают по 0,2 мл разведений сыворотки и 0,2 мл разведений антигена; кроме того, самое низкое разведение сыворотки (1:16) вносят в три лунки контроля сыворотки, а антиген каждого разведения вносят в лунки контроля комплемента. Вместо антигена в лунки контроля сыворотки и контроля буфера, а также вместо сыворотки в лунки контроля комплемента вносят соответствующий объем рабочего раствора вероналового буфера.

Панели встряхивают и выдерживают при комнатной температуре 10...15 мин. После этого в каждую лунку, содержащую сыворотку и антиген, добавляют по 0,4 мл охлажденного комплемента, содержащего 5 CH_{50}. В лунки контроля комплемента разливают по 0,4 мл комплемента, содержащего 5; 2,5 и 1,25 CH_{50} (табл. 1), что достигается соответствующим разведением комплемента, содержащего 5 CH_{50}. Панели встряхивают и помещают в термостат при температуре 37°С на 30 мин. В каждую лунку добавляют по

Таблица 1

Титрование антигена

Разведение антигена	Разведение сыворотки								Контроль О1		
	1:16	1:24	1:36	1:54	1:81	1:122	1:183	1:275	5 CH_{50}	2,5 CH_{50}	1,25 CH_{50}
1:2	0	0	0	0	0	30	80	95	100	70	0
1:4	0	0	0	0	10	30	80	95	100	90	10
1:6	0	0	0	10	30	30	80	95	100	90	10
1:8	0	0	30	30	30	80	80	95	100	90	10
1:12	0	30	30	30	90	90	90	100	100	90	20
1:16	50	70	70	70	90	90	100	100	100	90	20
1:24	60	90	90	90	90	90	100	100	100	95	50
1:32	90	90	100	100	100	100	100	100	100	95	50
Контроль сыворотки 1:16	–	–	–	–	–	–	–	–	100	90	30
Контроль буфера	–	–	–	–	–	–	–	–	100	100	50

0,2 мл сенсибилизированных эритроцитов, панели снова тщательно встряхивают и выдерживают при температуре 37°С 30 мин. После инкубации панели центрифугируют в специальных подвесках или отстаивают при температуре 4°С 12...18 ч и учитывают реакцию.

Оптимальным считают разведение антигена, дающее наивысший титр комплементсвязывающих антител (наибольшая фиксация) со специфической сывороткой. Выбор оптимального разведения антигена проводят только после проверки всех контролей (табл. 2).

Таблица 2

Приемлемый процент гемолиза в контролях комплемента

Контроль компонентов	5 CH_{50}	2,5 CH_{50}	1,25 CH_{50}
Антиген	100	85...100	0...75
Буфер	100	90...100	40...75
Сыворотка	100	90...100	0...75

При интерпретации каждой титрации антигена удобно провести линию, называемую кривой оптимального разведения (табл. 1), через конечную точку 30%-ного гемолиза каждого разведения антигена, которое не обладает антикомплементарностью (с интерполяцией в случае необходимости). В приведенном примере (табл. 1) разведение антигена 1:2 антикомплементарно, так как в контрольной лунке с 2,5 CH_{50} гемолиз был меньше 85%. Наивысшая фиксация комплемента отмечалась при разведении антигена 1:4, 1:6. Когда два разведения антигена дают идентичную реакцию связывания комплемента, выбирают высшее разведение (для данного примера 1:6).

е) Гипериммунная сыворотка

Титрование гипериммунной сыворотки проводят одновременно с титрованием антигена (см. табл. 1). Для получения достоверных и хорошо воспроизводимых результатов при постановке РСК для определения степени антигенного родства штаммов следует использовать только высокоактивные сыворотки с титром антител не ниже 1:81.

Постановка РСК по 50%-ному гемолизу при определении степени антигенного родства штаммов вируса ящура

Схема постановки реакции представлена в таблице 3. Заранее подготовленные разведения сывороток по 0,2 мл вносят в каждую лунку, за исключением ряда контроля комплемента и контроля антигена. В рядах контроля комплемента и антигена недостающее количество сыворотки заменяют соответствующим объемом буфера.

Антиген в оптимальном разведении вносят по 0,2 мл в соответствующие лунки реакции антиген — антитело и ряд лунок «контроль антигена» (см. табл. 3).

Разведения комплемента готовят перед постановкой реакции начиная с 1:10. Второе разведение (1:12,5) готовят путем смешивания 16 мл комплемента предыдущего разведения с 4 мл буфера. Дальнейшие разведения делают, соблюдая полуторакратный «шаг», для чего 8 мл комплемента предыдущего разведения разбавляют 4 мл вероналового буфера. В зависимости от активности комплемента готовят от 9 до 11 последовательных разведений. Каждое разведение комплемента помещают во флакон из темного стекла и до использования хранят на льду. Приготовленные разведения комплемента по 0,2 мл вносят в лунки соответствующих рядов, включая лунки контроля сыворотки и антигена (см. табл. 3). Панели хорошо встряхивают и помещают в термостат при температуре 37°С на 30 мин. После выдерживания в термостате во все лунки вносят по 0,4 мл суспензии сенсибилизированных эритроцитов, панели снова встряхивают и выдерживают в термостате при температуре 37°С 30 мин. Через 15 мин инкубации панели встряхивают повторно. После окончания инкубации панели центрифугируют или выдерживают 12...18 ч на холоде для осаждения неразрушенных эритроцитов и проводят учет реакции.

Учет реакции. Результаты реакции учитывают по 50%-ному гемолизу эритроцитов, отмечая в протоколе (см. табл. 3) точку 50%-ного гемолиза на месте пересечения координат соответствующих разведений сыворотки и комплемента. Если в одном из соседних разведений лизис эритроцитов больше, а в следующем меньше 50%, точка гемолиза отмечается на линии, обозначающей границу соседних разведений.

Схема постановки и учета РСК для определения антигенного

		Разведение С1 сыворотки	1	2	3	4	
Контроль сыворотки № 1	А	1:16					
		1:32					
		1:64					
		1:128					
		1:256					
		1:512					
		Контроль С°					
Сыворотка № 1 + антиген № 1	Б	1:16		22,0			
		1:32			17,77		
		1:64				12,80	
		1:128			×		
		1:256					
		1:512					
		Контроль антигена № 1					
Сыворотка № 1 + антиген № 2	В	1:16			12,80		
		1:32			×	10,66	
		1:64					
		1:128				×	
		1:256					
		Контроль антигена № 2					
Контроль сыворотки № 2	Г	1:16					
		1:32					
		1:64					
		1:128					
		1:256					
		1:512					
		Контроль С°					
Сыворотка № 2 + антиген № 2	Д	1:16	×	20,0			
		1:32		×	16,0		
		1:64			×	10,66	
		1:128					
		1:256				×	
		1:512					

Таблица 3

родства двух штаммов вируса ящура (№ 1 и № 2)

5	6	7	8	9	Общий С1	С1/мм³ сыворотки
	×	3,16				
	×					
	×					
	×					
	×					
	×					
	×					
					18,84	1,5
					14,61	2,34
					9,64	3,09
10,66					7,50	4,81
	5,69				2,53	3,24
	×	3,16			0	–
	×				Антиген 0	
					9,01	0,72
					6,87	1,1
8,53					4,44	1,42
	7,11				3,32	2,13
		5,69			1,90	2,44
					Антиген 0,63	
		3,79				
	×	3,16				
	×					
	×					
	×					
	×					
					15,58	1,24
					11,58	1,85
					6,87	2,2
8,53					4,74	8,04
7,11					3,32	4,26
×	4,74				0,95	2,44

		Разведение С1 сыворотки	1	2	3	4	
		Контроль антигена № 2					
Сыворотка № 2 + антиген № 1	Е	1:16				12,80	
		1:32			×		
		1:64					
		1:128					
		1:256					
		1:512					
		Контроль антигена № 1					

Количество связанного комплемента для каждого разведения сыворотки определяют по таблице 4, на которой сделан перерасчет содержания комплемента (мм³) в 0,2 мл разведения с учетом интерполяции. Найденное количество отмечают рядом с точкой 50%-ного гемолиза.

Для определения количества комплемента, неспецифически связанного антигеном, от количества комплемента, связанного в реакции «Контроль антигена», вычитают количество комплемента, вызывающего 50%-ный гемолиз эритроцитов при отсутствии антигена и антител. Найденное количество записывается в графу «антиген» (см. табл. 3).

Для определения количества комплемента, связанного комплексом антиген — антитело, при определенном разведении сыворотки от показателя общего количества связанного комплемента в точке 50%-ного гемолиза вычитают количество комплемента, фиксированного сывороткой данного разведения (см. табл. 3, А и Г), и количество комплемента, фиксированного антигеном. Например, при определении количества комплемента, связанного комплексом антиген — антитело, в реакции гомологичных компонентов штамма № 2 (см. табл. 3, Д) в разведении сыворотки 1:16 от общего количества связанного комплемента 22,0 мм³ вычитают количество С1, фиксированного сывороткой данного разведения, 3,79 мм³ (см. табл. 3, Г) и антигеном 0,63 мм³ (см. табл. 3, Д); полученный результат 15,58 мм³ записывают в графу «Общий С1» (см. табл. 3, Д).

Продолжение табл. 3

	5	6	7	8	9	Общий С1	С1/мм³ сыворотки
		3,79				Антиген 0,63	
						9,01	0,72
	10,66					6,87	1,1
		8,53				5,37	1,72
	×		4,74			1,58	1,01
			×	3,16		0	–
			×			0	–
			×			Антиген 0	

Таблица 4

Содержание комплемента (мм³) в объеме 0,2 мл с учетом разведения

Ряд	Разведение		Содержание С1 (мм³) в 0,2 мл разведения	
1	10		20,0	22,0
2	12,5	11,25	16,0	17,77
3	18,75	15,63	10,66	12,80
4	28,13	23,44	7,11	8,53
5	42,19	35,17	4,74	5,69
6	63,28	52,75	3,16	3,79
7	94,92	79,13	2,11	2,53
8	142,38	118,69	1,40	1,68
9	213,57	178,04	0,94	1,12
10	320,36	267,05	0,62	0,75

Для дальнейших расчетов определяют количество микролитров (мм³) комплемента, приходящегося на микролитр сыворотки, для чего количество «Общего комплемента» делят на фактор разведения сыворотки (см. табл. 5). Найденное значение записывают в графу «С1/мм³ сыворотки» (см. табл. 3).

Таблица 5

Факторы разведения сыворотки

Разведение	Фактор	Разведение	Фактор
1:8	25,00	1:256	0,78
1:16	12,50	1:512	0,39
1:32	6,25	1:1024	0,195
1:64	3,12	1:2048	0,098
1:128	1,56		

Для определения антигенного родства штаммов в расчет берут максимальные количества комплемента, пошедшего на микролитр сыворотки (зона оптимального связывания).

Найденные значения используют для определения r при установлении антигенного родства (R, %) по формуле Аркетти — Хорсфала

$$R = 100\sqrt{r_1 \cdot r_2}.$$

Таким образом, для приведенного примера

$$r_1 = \frac{2,44}{4,81} = 0,51; \quad r_2 = \frac{1,72}{4,26} = 0,40;$$

$$R = 100\sqrt{0,51 \cdot 0,40} = 43\%.$$

МИКРОМЕТОД

В последнее время для постановки и количественного учета РСК успешно применяется техника постановки реакции в малых объемах. Для этого используют наборы панелей с U-образной конфигурацией лунок и калиброванных капельных пипеток системы «Микротитр» или «Такачи». Реакцию ставят в объеме 0,125 мл, т. е. в 8 раз меньше, чем при описанном выше методе. Микрометод пригоден также для титрования сыворотки и антигена.

Техника подготовки реагентов, приготовления стандартов и постановки реакции такая же, как и при макрометоде, с учетом уменьшенного объема компонентов. Для определения количества связанного комплемента в реакции в таблице 4 делают перерасчет содержания комплемента в разведениях из расчета 0,025 мл.

Небольшой расход реагентов и быстрота разлива компонентов капельными микропипетками делают микрометод очень удобным при постановке перекрестных реакций, когда определяют антигенное родство нескольких штаммов.

В. Реакция диффузионной преципитации (РДП)[1]

Реакция диффузионной преципитации применяется для определения типов вируса ящура в патологическом материале и по сывороткам крови переболевших животных, а также для сравнительного изучения антигенных свойств эпизоотических штаммов вируса ящура. Сущность реакции диффузионной преципитации основана на том, что антиген и соответствующее ему антитело, диффундируя навстречу друг другу в агаровом геле, в месте соединения зон диффузии образуют линии преципитации.

Приготовление агаровой среды для реакции диффузионной преципитации

В 1 л дистиллированной воды растворяют 15 г агар-агара и 16 г хлористого натрия. Раствор агара доводят до кипения, добавляют к нему 50 мл 10%-ного раствора фенола и 0,03 г метилоранжа.

Хранят флаконы с агаром при комнатной температуре в течение 2 мес. или 6 мес. при 4°С.

Приготовление агаровых пластинок

Расплавленный на водяной бане агар разливают по 25 мл в чашки Петри с диаметром 9 см или на стеклянные пластинки размером 9×12 см. В застывшей агаровой пластинке специальными штампами изготовляют различные системы расположения луночек в зависимости от целей исследования.

При определении типов вируса ящура в патологическом материале и по сывороткам крови переболевших животных готовят шестиугольную систему расположения луно-

[1] Основные положения взяты из Наставления по постановке реакции диффузионной преципитации для идентификации штаммов вируса ящура, утвержденного Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 3 июня 1970 г.

чек, в которой одна луночка расположена в центре, а шесть луночек — вокруг. Диаметр каждой луночки 5 мм. Расстояние между ними 5 мм.

При сравнительном изучении антигенных свойств штаммов вируса ящура готовят треугольную систему расположения луночек. Диаметр луночек 5 мм, расстояние между ними 5 мм.

Определение в РДП типа вируса ящура по сывороткам крови переболевших животных

Компоненты реакции.

а) Антигены

Для постановки реакции используют антигены из очищенного и концентрированного лапинизированного вируса ящура типов О, А, С и др. С этой целью 20%-ную вирусосодержащую суспензию из мышечной ткани крольчат на физиологическом растворе двукратно промораживают при −20°С и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Затем к суспензии добавляют 20% химически чистого хлороформа и гомогенизируют в течение 7 мин в электроизмельчителе РТ-1 при 8000 об/мин. После центрифугирования при 6000 об/мин в течение 40 мин надосадочную жидкость сливают. На каждые 100 мл очищенного вируса добавляют 27 г сернокислого аммония и выдерживают при 4°С в течение 18 ч. Осадок отделяют центрифугированием при 5...6 тыс. об/мин в течение 20 мин и ресуспендируют в 1/10 исходного количества физиологического раствора. Полученный таким образом антиген инактивируют при 58°С в течение 4 ч.

Для проверки авирулентности антигенов 5 мышатам 5...7-дневного возраста подкожно вводят по 0,2 мл диализированного в течение 24 ч при температуре 4°С антигена. После введения антигена мышата должны оставаться здоровыми.

Контроль антигенов на активность и типовую специфичность осуществляют в РДП с использованием неразведенных преципитирующих антигенов и комплементсвязывающих сывороток морских свинок на гомо- и гетерологичные типы вируса. В случае положительной реакции антигена с сыворотками других типов его выбраковывают.

б) Сыворотки

В качестве испытуемых используют сыворотки не менее чем от 10 переболевших ящуром животных, отобранные не ранее 10-го дня после переболевания.

Непригодны для исследования в РДП сыворотки крови животных, дважды переболевших ящуром различных типов.

В качестве контрольных сывороток используют типоспецифические реконвалесцентные сыворотки крупного рогатого скота, полученные после заражения заведомо известным типом вируса ящура.

Постановка реакции.

В центральные лунки семи шестиугольных систем на агаровых пластинках помещают соответственно преципитирующие антигены типов О, А, С и др. В периферические лунки помещают пробы испытуемых и контрольных сывороток крови от переболевших ящуром животных. После постановки реакции агаровые пластинки выдерживают во влажной камере при температуре 37°С. Реакцию учитывают через 16, 24, 48 и 72 ч после ее постановки.

Положительная реакция характеризуется образованием одной или двух четких линий преципитации между лункой с антигеном и сывороткой. Вирус ящура относят к тому типу, с антигеном которого испытуемая сыворотка дает положительную реакцию. В случае обнаружения в сыворотках преципитирующих антител к двум и более типам вирус относят к тому типу, с антигеном которого испытуемые сыворотки дают наибольший процент положительных реакций.

Определение в РДП типа вируса ящура в патологическом материале

Компоненты реакции.

а) Антигены

Испытуемые антигены:

- лимфа из невскрывшихся афт больных ящуром животных в нативном неразведенном виде;

- поджелудочные железы павших от ящура животных в виде 50%-ной суспензии на физиологическом растворе с pH 7,6;
- контрольные антигены из очищенного и концентрированного вируса ящура типов О, А, С и др.

б) Сыворотки

В качестве сывороток используют типоспецифические гипериммунные сыворотки морских свинок типов О, А, С и др.

Постановка реакции.

В центральные лунки шестиугольных систем на агаровых пластинках помещают испытуемые и контрольные антигены, в периферические лунки — гипериммунные сыворотки морских свинок типов О, А, С и др.

Условия постановки реакции и учет результатов описаны выше.

Вирус ящура относят к тому типу, с сывороткой которого испытуемый антиген дает положительную реакцию.

Сравнительное изучение антигенных свойств эпизоотических штаммов вируса ящура в реакции диффузионной преципитации

Компоненты реакции.

а) Антигены

Антигены двух взятых для сравнительного изучения эпизоотических штаммов вируса ящура одного типа, которые предварительно адаптируют к организму двухдневных крольчат, готовят по методике, описанной выше.

б) Сыворотки

В реакции используют гипериммунные сыворотки морских свинок, полученные на изучаемые эпизоотические штаммы вируса ящура согласно существующей инструкции, утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 18 января 1968 г.

Постановка реакции.

В верхнюю лунку треугольных систем на агаровых пластинках помещают антиген одного из используемых штаммов вируса, а в верхнюю лунку слева — антиген другого изучаемого штамма.

В нижнюю лунку первой треугольной системы помещают гипериммунную сыворотку первого из изучаемых штаммов, а в нижнюю лунку второй треугольной системы — гипериммунную сыворотку другого штамма.

Условия постановки реакции и учет результатов описаны выше.

Изучаемые штаммы считают идентичными, если образовавшиеся линии преципитации между лунками с антигенами и сывороткой переходят одна в другую (сливаются) и выглядят как дуга.

Штаммы считают неидентичными, если образовавшиеся линии преципитации представляют собой дугу, от вершины которой отходят линии в виде «шпоры».

Примечание. Описанную выше методику постановки реакции можно использовать для изучения соответствия эпизоотических и производственных штаммов вируса ящура.

Г. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)[1]

Реакция пассивной гемагглютинации является ускоренным, чувствительным методом идентификации вируса ящура. Применяется для определения типов вируса ящура в стенках и содержимом афт больных ящуром животных (крупного рогатого скота, свиней, овец, морских свинок) и в вируссодержащих суспензиях из культур клеток и мышечной ткани крольчат, мышат. Сущность реакции заключается в том, что нагруженные антителами эритроциты агглютинируются при контакте с ящурным антигеном гомологичного типа.

[1] Разработана во ВНИИЯИ и рекомендуется для практического использования в качестве ускоренного метода типизации.

Компоненты реакции.

а) Аппаратура

Реакцию ставят в микротитраторе системы Такачи или в микропанелях из органического стекла. При постановке реакции в микротитраторе разведения антигенов готовят с помощью специальных пружинок (дайлютеров) объемом 0,05 мл.

Компоненты реакции разливают капельницами, позволяющими получить капли объемом 0,025 мл. При отсутствии микротитратора панели готовят по чертежу, антигены разводят в пробирках с помощью пипеток, а затем разливают в луночки микропанели шприцем «Рекорд» с иглой 1230, трубку которой укорачивают на половину длины и зачищают. Капли, полученные с помощью такой иглы, имеют объем 0,025±0,002 мл.

б) Растворы

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

1. *Физиологический раствор.* Готовят 0,85%-ный раствор поваренной соли (pH 7,2) и стерилизуют в автоклаве при +120°С 30 мин.

2. *Фосфатно-буферный раствор* (pH 7,2). Готовят из основных растворов:

- раствор А — 26,7 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в 1 л воды;
- раствор Б — 20,04 г KH_2PO_4 растворяют в 1 л воды.

Растворы разливают по флаконам, автоклавируют при +120°С 30 мин и хранят при комнатной температуре. Для приготовления рабочего фосфатно-буферного раствора смешивают 76,1 мл раствора А с 23,9 мл раствора Б и добавляют 100 мл физиологического раствора.

3. *Растворитель.* Готовят путем добавления в рабочий фосфатно-буферный раствор 1% нормальной сыворотки лошади, выпускаемой как компонент для РСК. Хранят при +4°С не более 3...5 сут.

4. *Консервант.* Готовят 0,3%-ный раствор фенола в фосфатно-буферном растворе или растворителе (в зависимости от назначения).

в) Антигены

Антигены готовят из стенок афт крупного рогатого скота, свиней, овец или морских свинок, мышечной ткани крольчат, мышат, а также из культур клеток, инфицированных вирусом ящура. Испытуемый материал растирают в ступке и готовят 10%-ную суспензию на физиологическом растворе. Суспензию переливают в центрифужный флакон, выдерживают 15 мин при комнатной температуре и центрифугируют при 2000...3000*g* 15 мин. Культуральные антигены и содержимое афт исследуют без всякой подготовки.

г) Антисыворотки

Для сенсибилизации эритроцитов применяют штаммоспецифические комплементсвязывающие ящурные сыворотки морских свинок, выпускаемые биопромышленностью как компонент для РСК. Для сенсибилизации эритроцитов пригодны не все серии сывороток, поэтому каждую вновь полученную серию антисыворотки необходимо проверять на способность сенсибилизировать эритроциты.

д) Бис-диазобензидин

Основной раствор бис-диазобензидина готовят впрок и хранят при −20°С до 5 мес. Для приготовления основного раствора в колбу, находящуюся в тающем льду, помещают раствор бензидина (0,43 г бензидина растворяют в 45 мл 0,1 н. соляной кислоты) и быстро добавляют охлажденный до 0°С раствор азотистокислого натрия (0,175 г азотистокислого натрия в 5 мл бидистиллированиой воды). Смесь выдерживают 30 мин при 0°С, быстро разливают по 1 мл во флаконы или ампулы и замораживают в сухом льду или в смеси поваренной соли со льдом. Полученный препарат должен иметь красно-коричневый цвет при отсутствии запаха аммиака.

е) Эритроцитарные диагностикумы

Этапы приготовления препарата.

1. *Получение эритроцитов барана.* Кровь барана смешивают в равных частях с раствором Альсевера и выдерживают при +4°С от 1 до 3 сут.

2. *Формалинизация эритроцитов.* К 100 мл смеси крови барана с раствором Альсевера быстро добавляют 40 мл 50%-ного раствора продажного формалина в физиологическом растворе, смесь выдерживают в водяной бане при 37°С в течение 1,5...2 ч, помешивая через каждые 15 мин. Формалинизированная кровь должна иметь темно-коричневый цвет и жидкую консистенцию. Эритроциты отмывают в физиологическом растворе 4 раза. Полученный осадок ресуспендируют в 200 мл физиологического раствора и оставляют на 2 сут при 4°С. После этого надосадочную жидкость сливают, а из осадка готовят 10%-ную суспензию эритроцитов на консерванте (без добавления сыворотки) и хранят при 4°С до 12 мес.

3. *Танизация эритроцитов.* Готовят основной раствор танина в физиологическом растворе (0,1 г танина в 100 мл физиологического раствора) и хранят при 4°С не более 10 сут. Формалинизированные эритроциты однократно отмывают и готовят 3%-ную суспензию их на физиологическом растворе.

Смешивают равные части полученной суспензии эритроцитов и рабочего разведения танина (1 часть основного раствора танина + 29 частей физиологического раствора). Смесь выдерживают в водяной бане при 37°С 15 мин, и эритроциты двукратно отмывают физиологическим раствором. Из полученного осадка эритроцитов готовят 3%-ную суспензию на консерванте (без добавления сыворотки) и хранят при 4°С до 6 мес. Контроль танизированных эритроцитов ставят через 18...24 ч после их приготовления. Для этого в луночке панели смешивают 1 каплю (0,025 мл) полученной суспензии эритроцитов и 2 капли (0,05 мл) растворителя. Через 2 ч эритроциты должны осесть на дно луночки в виде компактной точки.

4. *Сенсибилизация эритроцитов.* Активные гипериммунные, комплементсвязывающие сыворотки морских свинок разводят бидистиллированной водой 1:5 и добавляют 1/4 часть (по объему) хлороформа. Смесь интенсивно встряхивают в течение 20 мин и центрифугируют при 2000...3000*g* 15 мин. Полученную надосадочную жидкость переливают в широкогорлый флакон и, не закрывая, помещают в холо-

дильник при 4°С на 2...18 ч (до исчезновения запаха хлороформа), после чего разводят физиологическим раствором 1:5. Полученный раствор сыворотки смешивают с равным объемом 3%-ной суспензии отмытых физиологическим раствором танизированных эритроцитов. Затем 1 мл замороженного бис-диазобензидина быстро растворяют в 14 мл физиологического раствора и на каждые 5 мл смеси сыворотки с эритроцитами добавляют 1 мл раствора бис-диазобензидина или 0,5%-ного раствора хлористого хрома. Смесь встряхивают, выдерживают при комнатной температуре 10...15 мин и дважды отмывают растворителем. Осадок эритроцитов ресуспендируют в консерванте с добавлением нормальной сыворотки лошади из расчета получения 3%-ной суспензии эритроцитов. Полученный эритроцитарный диагностикум выдерживают при 4°С в течение 18 ч, затем готовят последовательные двукратные разведения гомологичного антигена (от 1:4 до 1:2048) и антигенов из вируса других типов (в объеме 0,05 мл) и в луночки всех рядов разведений антигенов добавляют по 1 капле (0,025 мл) полученной суспензии эритроцитов. Содержимое луночек смешивают путем постукивания по краю панели и панель оставляют при комнатной температуре на 1,5 ч. Эритроциты должны агглютинироваться антигеном из гомологичного штамма вируса и не агглютинироваться антигенами из других типов вируса. Если эритроциты агглютинируются и антигенами из других типов вируса, то диагностикум выдерживают при 4°С еще 2 сут и повторяют контроль. Одновременно готовят диагностикумы всех штаммов, нужных для проведения исследований. Диагностикумы хранят при 4°С в течение 4 мес.

Постановка реакции.

Готовят четыре ряда двукратных последовательных разведений антигена. После этого в луночки каждого ряда разведений антигена добавляют по 1 капле эритроцитарных диагностикумов: в первый ряд — типа 0, во второй — типа А, в третий — типа С, а в луночки последнего ряда — танизированные эритроциты. Содержимое луночек тщательно смешивают путем постукивания по краю панели

и оставляют при комнатной температуре на 2 ч, после чего учитывают результаты реакции:

++++ — эритроциты ровным слоем покрывают все дно луночки, в центре допустима небольшая точка;

+++ — эритроциты ровным слоем покрывают дно луночки, в центре хорошо заметна точка и диаметр осадка несколько меньше дна;

++ — эритроциты тонким слоем покрывают дно луночки, в центре заметно скопление эритроцитов в виде расплывшейся точки;

+ — осадок эритроцитов в виде точки с неровными краями большего диаметра по сравнению с точкой в контроле;

– — осадок эритроцитов в виде компактной, небольшой точки, соответствующей осадку в контроле (без антигена).

Титром антигена считают его наибольшее разведение, вызвавшее агглютинацию эритроцитов, оцениваемую в ++++. Исследуемый вирус относят к тому типу, с эритроцитарным диагностикумом которого антиген имеет титр на 2 или более логарифма выше, чем с эритроцитарными диагностикумами других типов.

В таблице 6 показан пример постановки реакции с целью определения типа вируса в эпизоотическом материале.

В примере, приведенном в таблице 6, испытуемый антиген отнесен к типу А, так как с эритроцитарным диагностикумом $А_{22}$ он имеет титр 1:64, а с остальными — 1:4.

Таблица 6

Пример постановки РПГА

Эритроцитарные диагностикумы	Разведение испытуемого антигена								Без антигена
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
О-194	++++	+	–	–	–	–	–	–	–
$А_{22}$	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	–	–
Сст	++++	+	–	–	–	–	–	–	–
Танизированные эритроциты	++++	+	–	–	–	–	–	–	–

Кроме того, данный антиген в высоких концентрациях способен неспецифически агглютинировать эритроциты, что подтверждается агглютинацией в пробе с танизированными эритроцитами, поэтому реакцию следует учитывать начиная с разведения антигена 1:8. Неспецифическую агглютинирующую способность антигена можно снять путем истощения его танизированными эритроцитами. Для этого 10 мл суспензии танизированных эритроцитов центрифугируют, надосадочную жидкость сливают, а к осадку добавляют 0,5 мл исследуемого антигена. Эритроциты ресуспендируют и смесь выдерживают 20 мин при 37°С или 40 мин при комнатной температуре. Эритроциты осаждают центрифугированием, а надосадочную жидкость исследуют в РПГА, как описано выше.

Д. Реакция угнетения связывания комплемента[1]

Реакция угнетения связывания комплемента (РУСК) применяется для определения типов вируса ящура по сывороткам переболевших животных, а также для обнаружения постинфекционных и поствакцинальных антител.

Компоненты реакции.

В реакции используют гемолизин, эритроциты барана, комплемент, гипериммунные сыворотки морских свинок, физиологический раствор. Указанные компоненты ничем не отличаются от таковых при постановке РСК.

а) Антигены

Типоспецифические ящурные антигены готовят из тканей больных ящуром крольчат. Для этого вируссодержащую мышечную ткань крольчат измельчают на электроизмельчителе и смешивают в соотношении 1:5 с фосфатно-солевым буфером pH 7,4. Полученную суспензию

[1] Методика с положительными результатами апробирована в лаборатории ВНИИЯИ и рекомендуется для типивации по сывороткам крови переболевших животных и для обнаружения постинфекционных и поствакцинальных антител.

выдерживают 30 мин при комнатной температуре, а затем двукратно проморaживают при 20°С. Оттаивают при 37°С. Размороженную суспензию центрифугируют при 2000 об/мин, а затем к вируссодержащей суспензии добавляют 20% хлороформа и гомогенизируют в электроизмельчителе в течение 7 мин при 8000 об/мин. Затем суспензию центрифугируют при 2000 об/мин в течение 40 мин, надосадочную жидкость сливают и фильтруют через ватно-марлевый фильтр для удаления липоидных пленок. После этого суспензию разбавляют 1:1 фосфатно-буферным раствором pH 7,4, чтобы получить конечное разведение 1:10.

В полученную суспензию добавляют 10% полиэтиленгликоля с молекулярным весом 6000. После растворения полиэтиленгликоля суспензию помещают в холодильник при +4°С на 18 ч для образования осадка.

Осадок отделяют центрифугированием при 5...6 тыс. об/мин в течение 30 мин и растворяют фосфатно-солевым раствором pH 7,4 в объеме в 100 раз меньшем, чем исходная суспензия.

Инактивируют полученный антиген 0,2% бетапропиолактона при комнатной температуре в течение 2 ч. На безвредность антиген проверяют на 8 мышатах-сосунах путем подкожного введения по 0,2 мл его 10%-ного раствора.

Полученный таким образом авирулентный антиген исследуют в РСК с целью определения его активности. Титр антигена (в РСК) должен быть не ниже 1:32.

б) Испытуемые сыворотки

Используют сыворотки крови, отобранные от переболевших ящуром или вакцинированных животных. Перед постановкой опыта сыворотки разводят 1:2 физиологическим раствором и инактивируют при 58°С в течение 30 мин.

Определение типов вируса ящура

При определении типов вируса ящура перед проведением главного опыта антиген и гипериммунные ящурные сыворотки титруют в РСК по шахматной схеме и берут их в реакцию в предельном титре (табл. 7).

Таблица 7

Схема титрования антигена и сыворотки в РСК

Сыворотка	Разведение антигена							Без антигена
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
1:5	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	–
1:10	++++	++++	++++	++++	++++	++	–	–
1:20	++++	++++	++++	++++	++++	–	–	–
1:40	+++	+++	++	+	–	–	–	–
б/с	–	–	–	–	–	–	–	–

В данном случае титр сыворотки 1:20, а титр антигена 1:32.

Количество компонентов и последовательность их введения в реакцию показаны в таблице 8.

Результаты реакции учитывают сразу же после постановки реакции, через 1 ч и через 12...16 ч.

При положительном результате наблюдается гемолиз, при отрицательном — отсутствие его. Процент гемолиза оценивается в крестах: ++++ — 100%-ный гемолиз; +++ — 75%-ный гемолиз; ++ — 50%-ный гемолиз; + — 25%-ный гемолиз; – — отсутствие гемолиза.

Если гемолиз наблюдается во всех трех пробирках с антигенами О, А и С при положительных контролях, сыворотку раститровывают и по высоте титра антител определяют тип вируса ящура.

В РУСК титр испытуемой сыворотки к антигену гомологичного типа будет значительно выше, чем к антигенам гетерологичного типа.

С целью определения титра антител к вирусу ящура в РУСК готовят ряд двукратных разведений испытуемой сыворотки (1:2, 1:4, 1:8 и т. д.), которые исследуют с антигеном гомологичного типа.

Схема постановки реакции при определении титра антител в сыворотках крови приводится в таблице 9.

Таблица 8

Определение типа вируса ящура по сывороткам крови переболевших животных

Время инкубации в водяной бане	Реагенты	Антигены типов			Контроль антикомплементарности сывороток				Контроль антигена			Гемолитическая активность сывороток				Контроль типоспецифичности		
		А	О	С	А	О	С	испытуемой	А	О	С	А	О	С	испытуемой	А	О	С
Первая фаза — 20 мин при 37°С	Испытуемая сыворотка	0,1	0,1	0,1	–	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–	–
	Антигены																	
	А	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–
	О	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–
	С	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1
	Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Физиологический раствор	–	–	–	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1
Вторая фаза — 30 мин при 37°С	Гиперимунная сыворотка																	
	А	0,1	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–	–	0,1	–	–
	О	–	0,1	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	0,1	–	–	–	0,1	–
	С	–	–	0,1	–	–	0,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,1
Третья фаза — 20 мин при 37°С	2%-ная взвесь эритроцитов	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Гемолизин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	–	–	–	–	0,1	0,1	0,1

Таблица 9

Схема постановки РУСК при определении титра антител к вирусу яшура в сыворотках крови переболевших и вакцинированных животных

Время инкубации в водяной бане	Реагенты	Разведение испытуемой сыворотки						Контроль			
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	испытуемой сыворотки	антигена	гемолитической активности испытуемой сыворотки	гемолитической активности гипериммунной сыворотки
Первая фаза — 20 мин при 37°С	Испытуемая сыворотка	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	–	0,1	–
	Антиген	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	0,1	0,1
	Физиологический раствор	–	–	–	–	–	–	0,2	0,2	0,3	0,3
Вторая фаза — 30 мин при 37°С	Гипериммунная сыворотка морских свинок	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	–	–	–	0,1
Третья фаза — 30 мин при 37°С	2%-ная взвесь эритроцитов	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Гемолизин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	–	–

2. Биологические методы

А. Определение типа и варианта вируса ящура методом перекрестного иммунитета на переболевших и вакцинированных животных

Сущность метода заключается в том, что крупный рогатый скот, переболевший ящуром неизвестного типа, через 21...30 дней подвергается заражению вирусом 7 известных типов. Для этого на каждый тип в опыт берут 4 головы переболевшего крупного рогатого скота и 2 контрольных животных, ранее не болевших ящуром. Заражают животных инъекцией под слизистую языка 10 000 $ИД_{50}$ вируса по 0,2 мл в две точки.

Испытуемый штамм вируса относят к тому типу, после заражения которым переболевшие животные не заболели ящуром при генерализованном процессе у контрольных животных и у переболевших животных, инфицированных другими типами вируса.

Метод перекрестного иммунитета на морских свинках сходен с методом испытания иммунитета на крупном рогатом скоте и применяется для определения типовой принадлежности вируса ящура.

Заражают морских свинок интраплантарно адаптированным к морским свинкам испытуемым штаммом вируса ящура. После выздоровления от генерализованного процесса морских свинок разбивают на группы и реинфицируют в дозе 10 000 $ИД_{50}$ вирусом эталонных типов. На каждый штамм берут минимум 6 переболевших морских свинок.

Испытуемый штамм вируса относится к тому типу, после заражения которым переболевшие морские свинки не заболевают ящуром.

Определение варианта вируса ящура методом перекрестного иммунитета на вакцинированном крупном рогатом скоте применяется для установления иммунологического соответствия эпизоотического штамма вируса ящура производственному.

Методика опыта заключается в следующем: крупный рогатый скот в возрасте 2...3 лет в количестве 24 голов разбивают на две группы (по 12 голов в группе). Животных

I группы иммунизируют вакциной, приготовленной из производственного штамма вируса ящура того же типа.

Животных II группы иммунизируют вакциной из испытуемого штамма вируса.

Через 21 день после вакцинации каждую группу разбивают на две подгруппы по 6 животных.

Животных первых подгрупп (обеих групп) заражают испытуемым вирусом, животных вторых подгрупп — производственным (афтозным) штаммом вируса ящура, используемым для контроля активности вакцины. В качестве контроля вируса в каждой подгруппе подставляют по 2 восприимчивых (невакцинированных) животных того же возраста, что и вакцинированные. Заражают инъекцией под слизистую языка 10 000 $ИД_{50}$ вируса по 0,2 мл в две точки.

Штаммы считают идентичными, если вакцина предохраняет животных от генерализации процесса при заражении используемыми штаммами. В случае иммунологического отличия штаммов вакцинированные животные, инфицированные гетерологичным штаммом, заболевают генерализованной формой ящура.

Б. Реакция серозащиты на мышатах-сосунах

Реакцию серозащиты (РЗ) применяют для определения типа вируса ящура по сывороткам переболевших животных и в патологическом материале, а также вариантной принадлежности и степени антигенного родства штаммов вируса ящура[1].

Компоненты реакции.

Физиологический раствор. Готовят 0,85%-ный раствор поваренной соли в дистиллированной воде (pH 7,5...7,6) и стерилизуют в автоклаве при температуре 120°С в течение 30 мин. Перед употреблением на каждый миллилитр раствора добавляют по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина.

[1] Основные положения взяты из «Наставления по идентификации типов и вариантов вируса ящура и определению биологическим методом соответствия эпизоотических штаммов вируса производственным», утвержденного Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 6 августа 1969 г.

Мышата в возрасте 4...7 сут.

Вирус ящура. Используют адаптированные к мышатам эталонные штаммы вируса ящура (типов О, А, С и др.), а также эпизоотические штаммы вируса. Из тушек мышат, павших после инфицирования вирусом ящура, готовят 10%-ную суспензию на консервирующей жидкости, состоящей из равных частей нейтрального глицерина и фосфатно-буферного раствора (pH 7,5...7,6) или на среде Игла. Вируссодержащую суспензию хранят при температуре −20...−60°С в течение 3...6 мес. и титруют на мышатах по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывают по методу Рида и Менча (1938) или Кербера (1931) и выражают в логарифмах с основанием десять.

Иммунные сыворотки. В реакции используют сыворотки переболевших ящуром животных: крупного рогатого скота, свиней, овец и морских свинок, отобранные на 14...36-й день после заболевания ящуром.

Постановка реакции.

Определение типа вируса ящура по сывороткам крови переболевших животных

Испытуемую сыворотку разводят физиологическим раствором 1:5 или используют жидкость, полученную, после экстракции на физиологическом растворе кусочков фильтровальной бумаги, на которой была высушена сыворотка. Отбирают 28 мышат и 3 лактирующих самок. Под кожу 16 мышатам вводят по 0,2 мл раствора сыворотки, а 12 мышат оставляют в качестве контрольных. Через 2...3 ч мышатам вводят вирус типов О, А и С. Каждый тип вируса вводят 4 мышатам, которым ранее была введена сыворотка, и 4 контрольным мышатам. Вирус вводят под кожу спины в дозе 0,2 мл с содержанием 1000 $ЛД_{50}$.

Мышат всех групп метят и наблюдают за ними в течение 7 дней.

Вирус ящура, вызвавший заболевание животных в хозяйстве, относят к тому типу, при заражении которым привитые сывороткой мышата остались живы. Например, если мышата, зараженные вирусом типа О и типа С, пали, а зара-

женные вирусом типа А выжили, то вирус относят к типу А. Все мышата, которым ввели вирус типов О, А и С (без сыворотки), должны погибнуть, а мышата, которым ввели только сыворотку (без вируса), должны выжить. Только при этом условии результаты реакции можно считать достоверными.

Определение типа вируса ящура в патологическом материале

Тип вируса ящура в реакции серозащиты определяют в том случае, если поступивший материал не активен в РСК. Реакцию ставят с сыворотками переболевших ящуром животных или с гипериммунными сыворотками морских свинок, которые используют как компоненты для РСК.

Перед постановкой реакции сыворотки титруют и разводят с таким расчетом, чтобы в 0,2 мл разведения сыворотки содержалось 2 защитные дозы ($3Д_{50}$). Например, если титр сыворотки 6,2, то рабочее разведение будет 1:37. Таким образом готовят разведения сывороток типов О, А и С и сыворотку каждого типа вводят под кожу 4 мышатам по 0,2 мл. К ним подсаживают 4 контрольных мышат и 2 лактирующих самок. Через 2...3 ч после введения сыворотки всем мышатам вводят по 0,2 мл 10%-ной суспензии испытуемого материала. Перед введением мышатам к суспензии добавляют пенициллин и стрептомицин по 1000 ЕД на 1 мл суспензии. За мышатами наблюдают в течение 7 дней.

Вирус ящура относят к тому типу, сыворотка против которого защищает мышат от гибели. Например, если мышата, привитые сывороткой типов А и С, погибли, а привитые сывороткой типа О выжили, то вирус относят к типу О. Реакцию можно учитывать только в том случае, когда все мышата, инфицированные вирусом без сыворотки, погибли (контроль вируса).

Определение вариантной принадлежности вируса ящура и соответствия эпизоотических штаммов вируса производственным

Для определения вариантной принадлежности эпизоотических и производственных штаммов вируса ящура отбирают 208 мышат и 18 лактирующих маток. Мышат

Таблица 10

Иммунные сыворотки	Штаммы вируса ящура			
	производственный		эпизоотический	
	№ клетки	мышат	№ клетки	мышат
На производственный штамм вируса	1	36	4	36
На эпизоотический штамм вируса	2	36	5	36
Без сыворотки	3	32	6	32

Таблица 11

Иммунные сыворотки	Штаммы вируса ящура					
	производственный			эпизоотический		
	титр вируса	индекс защиты	обозначения	титр вируса	индекс защиты	обозначения
На производственный штамм вируса	3,50	3,70	в	5,0	1,90	а
На эпизоотический штамм вируса	5,60	1,60	$а_1$	4,60	2,30	$в_1$
Без сыворотки	7,20	–	–	6,90	–	–

помещают в клетки в количестве, указанном в таблице 10, и в каждую клетку подсаживают по 3 лактирующие самки.

Иммунные сыворотки разводят с таким расчетом, чтобы в 0,2 мл содержалось 2 $ЗД_{50}$.

Мышатам в клетках 1 и 4 вводят сыворотку производственного штамма, а мышатам в клетках 2 и 5 — сыворотку эпизоотического штамма. В каждой клетке сыворотку вводят только 32 мышатам, а 4 мышат оставляют в качестве контроля. Через 2...3 ч после введения сыворотки на мышатах в клетках 1, 2 и 3 титруют производственный штамм вируса, а на мышатах в клетках 4, 5 и 6 — эпизоотический штамм.

Перед титрованием вируса готовят десятикратные разведения вируса каждого штамма и каждое разведение вводят 4 мышатам. Титр вируса рассчитывают по методу Рида и Менча или Кербера.

За мышатами наблюдают в течение 7 дней и титры вируса заносят в специальную таблицу. В качестве примера приведены результаты опыта (табл. 11).

При расчете индекса защиты из значения логарифма титра вируса на мышатах без сыворотки вычитают значение логарифма титра вируса на мышатах, привитых сывороткой. В данном примере индекс защиты «в» = = 7,20 – 3,50 = 3,70; индекс «а» = 6,90 – 5,00 = 1,90; «$а_1$» = = 7,20 – 5,60 = 1,60; «$в_1$» = 6,90 – 4,60 = 2,30.

Степень антигенного родства R (%) определяют по формуле

$$R = 100\sqrt{r_1 - r_2} \cdot 100; \quad r_1 = \frac{a}{b_1}, \quad r_2 = \frac{a_1}{b_1}.$$

Антигенные свойства изучаемых штаммов вируса ящура оценивают по критериям антигенного родства, согласно которым штаммы, имеющие антигенное родство от 0 до 15%, относят к различным типам вируса, штаммы с антигенным родством от 15 до 70% — к различным вариантам одного типа; штаммы с антигенным родством от 70 до 100% — к одному и тому же варианту.

В. Реакция нейтрализации вируса в культуре ткани[1]

Реакцию серонейтрализации (РН) на культурах клеток применяют для определения типа вируса ящура по сывороткам крови переболевших животных и в патологическом материале, а также для установления степени антигенного родства и соответствия эпизоотических штаммов вируса ящура производственным.

Компоненты реакции.

Растворы и питательные среды. Для приготовления и выращивания культур клеток применяют 0,25%-ный раствор трипсина, 0,02%-ный раствор версена, 7,5%-ный

[1] Основные положения взяты из «Наставления по определению вариантной принадлежности и степени антигенного родства штаммов вируса ящура реакцией нейтрализации с использованием культур клеток», утвержденного Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 25 января 1972 г.

раствор двууглекислого натрия, 0,5%-ный раствор лактальбумина на растворе Хенкса, среду Игла, которые готовят по общепринятым методикам. Ростовые среды должны иметь pH 7,2...7,4, а поддерживающие — 7,5...7,6.

Культура клеток. В реакции используют однослойную первичную культуру клеток эмбрионов свиней (ПЭС), культуру перевиваемых клеток почек свиней (СПЭВ).

Вирус ящура. Перед постановкой реакции используемые штаммы вируса ящура адаптируют к культурам клеток и сохраняют в холодильниках при температуре −50...−70°С.

Иммунные сыворотки. Сыворотки отбирают от 5...10 переболевших ящуром животных (крупного рогатого скота, свиней, овец, морских свинок) через 10...60 дней после их заболевания. Хранят сыворотки крови в замороженном состоянии при температуре −8...−20°С.

Определение типа вируса ящура по сывороткам крови переболевших животных

Пробу испытуемой сыворотки разводят питательной средой 1:16, добавляют по 500 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл и разливают в три пробирки, после чего добавляют вирус ящура с таким расчетом, чтобы в 0,1 мл суспензии содержалось 100 $ТЦД_{60}$ вируса. В пробирку № 1 добавляют вирус типа О, в пробирку № 2 — вирус типа А, в пробирку № 3 — вирус типа С. Смесь вируса с сывороткой выдерживают в термостате при температуре 37°С в течение часа, а затем по 0,2 мл содержимого каждой пробирки вносят в 4 пробирки с хорошо выраженным монослоем культуры клеток и добавляют по 0,8 мл питательной среды без сыворотки. Одновременно ставят контроль используемых штаммов вируса ящура, для чего по 0,1 мл вируссодержащей суспензии вносят в 4 пробирки с культурой клеток. Таким образом, для постановки реакции необходимо иметь 24 пробирки культур клеток. Все пробирки помещают в термостат при температуре 37°С на 3...4 сут и читают реакцию на наличие ЦПД. Отсутствие ЦПД в пробирках, в которые внесена смесь вируса с сывороткой, при четко выра-

женном ЦПД в контрольных пробирках указывает на наличие в исследуемой сыворотке антител против данного типа вируса ящура.

Специфичность ЦПД можно установить путем исследования в РСК культуральной жидкости, полученной из пробирок с выраженным ЦПД.

Определение типа вируса ящура в патологическом материале

Из исследуемого материала готовят суспензию на среде Игла 1:10, центрифугируют при 3000...4000 об/мин в течение 10...15 мин и фильтруют через бактериальный фильтр. Если нет возможности профильтровать суспензию, в нее добавляют по 1000 ЕД пенициллина и 500 ЕД стрептомицина на каждый миллилитр.

Подготовленную суспензию разливают по 1 мл в 4 пробирки.

Иммунные сыворотки типов О, А и С разводят с таким расчетом, чтобы в 0,1 мл содержалось 50 $НД_{50}$. Для этого сыворотки предварительно титруют, после чего готовят разведения, исходя из логарифма титра сыворотки. После этого в пробирку № 1 добавляют 1 мл разведения сыворотки типа О, в пробирку № 2 — 1 мл сыворотки типа А, в пробирку № 3 — 1 мл сыворотки типа С. В пробирку № 4 добавляют 1 мл среды Игла (контроль вируса). Все пробирки выдерживают 1 ч в термостате при температуре 37°С. Затем по 0,2 мл содержимого каждой пробирки вносят в 4 пробирки с монослоем культур клеток и добавляют по 0,8 мл питательной среды. Кроме того, в 4 пробирки с культурой клеток вносят по 1 мл питательной среды (контроль культуры ткани). Все пробирки помещают в термостат при 37°С и через 3...4 дня читают реакцию.

Вирус ящура относят к тому типу, сыворотка против которого предотвращает ЦПД в культурах клеток, инфицированных вирусом.

Методические указания составлены сотрудниками Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института МСХ СССР (А. И. Собко, А. И. Гриценко, Л. Н. Соколов, Ю. А. Черняев, В. Н. Прохоров, Б. А. Прискока).

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*
— иммунодиффуаии (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) 138
Ринопневмония 140
2.3. Методические указания по лабораторной диагностике *ринопневмонии лошадей* (утверждены 27 августа 1980 г., б/н) 140
Инфекционная анемия 145
2.4. Инструкция по применению набора для диагностики инфекционной анемии лошадей в реакции диффузионной преципитации (РДП) (утверждена 24 марта 2009 г.) 145

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

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

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

4. **Болезни мелкого рогатого скота** 276
Аденоматоз овец и коз 276
4.1. Временные методические указания по лабораторной диагностике аденоматоза овец и коз (утверждены 2 июля 1985 г.) 276
Висна-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., № 18-7-2/1241) 617
Коронавирусы собак и кошек 625
7.9. Инструкция по применению тест-системы «КОРОНАВИР» для выявления и идентификации коронавирусов кошек и собак методом полимеразной цепной реакции (утверждена 14 декабря 2009 г.) 625

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

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Составители:
Петр Иванович БАРЫШНИКОВ,
Валентина Владимировна РАЗУМОВСКАЯ

Учебное пособие

Издание второе, исправленное

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

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

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

Где купить

Для организаций:

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

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

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
«Виолион»: 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





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

ISBN 978-5-8114-1882-4



gost.e-ecolog.ru